



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA



ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS NO CONTROLE DA  
MANCHA-ALVO CAUSADA POR *Corynespora cassicola* EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*)

JOÃO PAULO FONSECA TAVARES

MANAUS - AM

Junho/2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

JOÃO PAULO FONSECA TAVARES

ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS NO CONTROLE DA  
MANCHA-ALVO CAUSADA POR *Corynespora cassicola* EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. ROGÉRIO EIJI HANADA

MANAUS - AM

Junho/2021

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T231ó Tavares, João Paulo Fonseca  
Óleos essenciais com potenciais antifúngicos no controle da mancha-alvo causada por *Corynespora cassiicola* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) / João Paulo Fonseca Tavares . 2021  
71 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rogério Eiji Hanada  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Controle alternativo. 2. Metabolismo secundário. 3. Proteção. 4. Fitopatógenos. 5. Óleos essenciais. I. Hanada, Rogério Eiji. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JOÃO PAULO FONSECA TAVARES

ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS NO CONTROLE DA  
MANCHA-ALVO CAUSADA POR *Corynespora cassiicola* EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*)

Examinador(a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Prof. Dr. Rogério Eiji Hanada (Presidente)	X	
Profa. Dra. Larissa Kirsch Barbosa (Membro)	X	
Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro (Membro)	X	
<b>Parecer Final</b>	X	

Nada mais havendo a tratar, eu, Rogério Eiji Hanada, dei por encerrada a reunião e lavrei a presente ata que segue assinada por mim, pelos demais membros da banca examinadora e pelo coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

em Manaus, 30 de junho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Edmar Vaz de Andrade, Coordenador**, em 01/07/2021, às 08:50, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rogério Eiji Hanada, Usuário Externo**, em 01/07/2021, às 09:18, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Kirsch Barbosa, Usuário Externo**, em 01/07/2021, às 10:26, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Cleomir de Souza Pinheiro, Usuário Externo**, em 05/07/2021, às 16:23, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0571813** e o código CRC **C17D0962**.

Aos meus pais **Dilza Lopes Fonseca** e **Raimundo Azevedo Tavares** (*in memoriam*) por moverem o mundo e acreditarem na minha capacidade. As minhas irmãs (**Gilvana**, **Natália**, **Tamara** e **Thaís**) e sobrinhos (**Ana Lúcia**, **Enrico**, **Alexia** e **Miguel**) que são meu maior motivo para continuar lutando.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus por ter me dado força, sabedoria, discernimento e principalmente por ter colocado pessoas incríveis na minha vida, as quais foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por dar oportunidades a nós estudantes. A FAPEAM pela concessão da bolsa de mestrado e ao Projeto Universal/FAPEAM (02/2018), pelo suporte financeiro ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Rogério Eiji Hanada pela orientação durante esse período do mestrado, por todo conhecimento transmitido, paciência e compreensão.

Ao Dr. Francisco Célio Maia Chaves e ao Laboratório Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental por ter cedido os óleos essenciais e por toda a disponibilidade, quando solicitado.

Ao Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro, por ter me auxiliado nas análises químicas dos óleos essenciais e por contribuir de forma relevante com esse trabalho.

Aos técnicos de laboratório de fitopatologia Luiz Alberto Guimarães de Assis e Marilene Maia Braga (*in memoriam*), por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa, sempre auxiliando com muita dedicação e atenção.

À Samara Oliveira, que me acolheu e ajudou durante as etapas dos testes no Laboratório.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, minhas irmãs, meus sobrinhos, tias, tios, primas e primos, que mesmo de longe sempre me apoiaram em conquistar meus objetivos e sonhos.

Aos meus amigos João Bosco Nogueira, Ítalo Fernando e Valéria Medeiros, pela amizade e momentos de descontração e, principalmente, pelo apoio nos momentos que mais precisei.

Ao Joseph Araújo Lopes que foi que fundamental durante todo esse processo, sendo um parceiro em todos os momentos.

E a todos que de qualquer forma contribuíram para esse sonho se tornar realidade!

**GRATO**

## RESUMO

O tomate é um dos principais produtos hortícolas em todo o mundo devido a sua importância nutricional e econômica. Entretanto, alguns problemas fitossanitários limitam o cultivo dessa hortaliça. Na região Norte do país, a mancha-alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* está entre as doenças mais importantes que infectam a parte aérea do tomateiro. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos óleos essenciais de espécies dos gêneros *Lippia*, *Mentha* e *Ocimum*, no controle da mancha-alvo na cultura do tomateiro. Foram realizadas extração dos óleos essenciais, análise química dos óleos, avaliação do efeito dos óleos no crescimento micelial do fungo, na porcentagem de inibição da esporulação, na porcentagem de inibição da germinação dos conídios e na severidade da doença, em casa-de-vegetação. Os valores foram submetidos à análise de variância, com auxílio do programa Sisvar versão 5.3, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os componentes majoritários dos OEs foram, para *L. sidoides* (timol - 89,1%), *M. arvensis* (mentol - 89,8%), *M. piperita* (mentol - 38,3%), e *O. gratissimum* (1,8-cineol - 47,9%). No ensaio *in vitro*, os óleos essenciais de *L. gracilis*, *L. sidoides* e *M. arvensis* inibiram o crescimento micelial e a produção de conídios do fitopatógeno. Observou-se também que os óleos dessas espécies e o de *M. piperita* inibiram a germinação dos conídios do fitopatógeno. No ensaio *in vivo*, os óleos essenciais de *L. gracilis* e *L. sidoides* reduziram a severidade da mancha-alvo.

**Palavras-chave:** controle alternativo, metabolismo secundário, proteção, fitopatógenos, óleos essenciais.

## ABSTRACT

Tomato is one of the main horticultural crops worldwide due to its nutritional and economic importance. However, some phytosanitary problems limit the cultivation of this vegetable. In the northern region of the country, the target spot caused by the fungus *Corynespora cassiicola* is among the most important diseases that attack the aerial part of the tomato. The objective of this work was to evaluate the potential of essential oils of some species of the genera *Lippia*, *Mentha* and *Ocimum*, in the control of the target spot in tomato crop. Essential oil extraction, pathogenicity test, chemical analysis of oils, evaluation of the effect of oils on mycelial growth index, percentage of inhibition of sporulation, percentage of inhibition of germination and evaluation of disease severity in greenhouse were evaluated. The analyses of the results were performed with the aid of the SISVAR version 5.3 program. The values were submitted to variance analysis and the means compared by the Scott-Knott test, at 5% significance. Chemical analysis of essential oils revealed the major components for *Lippia sidoides* (thymol – 89.1%), *Mentha arvensis* (menthol – 89.8%), *Mentha piperita* (menthol – 38.3 %), and *Ocimum gratissimum* (1.8-cineol – 47.9%). In the *in vitro* assay, *Lippia gracilis*, *L. sidoides* and *M. arvensis* treatments had the lowest mycelial growth index and the highest percentage of sporulation inhibition. Regarding the percentage of germination inhibition, the highest value was obtained with the treatments *Lippia gracilis*, *L. sidoides*, *M. arvensis* and *M. piperita*. In the *in vivo* assay, the essential oils of *L. gracilis* and *L. sidoides* showed better performance in controlling the severity of the disease.

**Keywords:** alternative control, secondary metabolism, protection, phytopathogen, essential oils.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ranking dos 10 maiores produtores de tomate por Unidade Federativa do país – ano 2020. Fonte: IBGE (2020).....18
- Figura 2:** Sintomas de mancha-alvo, causadas por *Corynespora cassiicola*, em frutos (A) e em folha de tomateiro (B).....20
- Figura 3:** Esquema das atividades realizadas no experimento de avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre a severidade da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) em tomateiro.....34
- Figura 4:** Escala de notas para avaliação da severidade de mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) em folíolos de tomateiro. Adaptada por COSTA (2012).....35
- Figura 5:** Perfis cromatográficos dos óleos essenciais: (A) *Lippia sidoides*; (B) *Ocimum gratissimum*. .....36
- Figura 6:** Perfis cromatográficos dos óleos essenciais: (C) *Mentha piperita*; (D) *Mentha arvensis*. .....37
- Figura 7:** Estrutura molecular do fenol timol, principal constituinte do óleo essencial de *L. sidoides*. Fonte: FLAMINI (2012).....39
- Figura 8:** Estrutura molecular do óxido 1,8-cineol (a) e fenol eugenol (b), principais constituintes do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. Fonte: (FLAMINI, 2012; GAZOLLA *et al.*, 2018) .....40
- Figura 9:** Estrutura molecular do mentol (A), mentona (B) segundo FLAMINI (2012) e acetato de lavandulil (C) segundo HAMILTON *et al.* (2005), principais constituintes do óleo essencial de *Mentha piperita*.....41
- Figura 10:** Crescimento micelial do fungo *Corynespora cassiicola* em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleos essenciais de *Lippia sidoides* (LS) e *Lippia gracilis* (LG), após nove dias de cultivo, à temperatura ambiente e sob luz contínua.....45
- Figura 11:** Crescimento micelial do fungo *Corynespora cassiicola*, em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita* (MP) e *M. arvensis* (MA), após nove dias de cultivo, à temperatura ambiente e sob luz contínua.....47
- Figura 12:** Crescimento micelial do fungo *Corynespora cassiicola*, em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, após nove dias de cultivo, à temperatura ambiente e sob luz contínua.....49
- Figura 13:** Curvas de progresso da mancha-alvo em tomateiros tratados com óleos essenciais na dosagem de 0,2%.....53

**Figura 14:** Curvas de progresso da mancha-alvo em tomateiros tratados com óleos essenciais na dosagem de 1,0%.....54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dosagens de óleos essenciais utilizadas para avaliar o efeito na severidade da mancha-alvo em tomateiro, utilizando o método de pulverização.....	32
<b>Tabela 2:</b> Composição química (%) do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.....	38
<b>Tabela 3:</b> Composição química (%) do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> L., determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.....	39
<b>Tabela 4:</b> Composição química (%) do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> , determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.....	40
<b>Tabela 5:</b> Composição química (%) do óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.....	42
<b>Tabela 6:</b> Índice de crescimento micelial (ICM) de <i>Corynespora cassiicola</i> , cultivado em meio BDA contendo diferentes concentrações de óleos essenciais, durante 9 dias.....	42
<b>Tabela 7:</b> Diâmetro da colônia (cm) de <i>C. cassiicola</i> , cultivado em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleos essenciais, durante 9 dias.....	43
<b>Tabela 8:</b> Porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de <i>Corynespora cassiicola</i> submetido a diferentes concentrações dos óleos essenciais.....	50
<b>Tabela 9:</b> Porcentagem de inibição da germinação de conídios (PIG) de <i>Corynespora cassiicola</i> mantidas em câmara úmida, em estufa, à 22 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 24 horas.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

± - Mais ou menos

μg - Micrograma

μL - Microlitro

AM - Amazonas

APX - Ascorbato peroxidase

ATP - Adenosina trifosfato

BDA - Batata dextrose ágar

BOD - Demanda de oxigênio bioquímico

CAT - Catalase

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CFM - Concentração Fúngica Mínima

CG - Cromatografia gasosa

cm - Centímetro

CMI - Concentração Mínima Inibitória

DIC - Delineamento inteiramente casualizado

DTe - Diâmetro da testemunha

DTr - Diâmetro do tratamento

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ETe - Esporulação da testemunha

ETr - Esporulação do tratamento

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

GPOX - Guaicol peroxidase

GR - Glutathione redutase

GTe - Germinação da testemunha

GTr - Germinação do tratamento

h - Hora

ha - Hectare

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICM - Índice de crescimento micelial

IK Cal. - Índice de Kovats calculado

IK lit. - Índice de Kovats encontrado na literatura

Inpa - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

kg - Quilograma

L - Litro

LG - *Lippia gracilis*

LS - *Lippia sidoides*

m - Metro

m/z - Faixa de massa

MA - *Mentha arvensis*

mg - Miligrama (s)

mL - Mililitros

mm - Milímetro

MP - *Mentha piperita*

MS - Espectrometria de massa

°C - Grau Celsius

OE - Óleo essencial

OEs - Óleos essenciais

OG - *Ocimum gratissimum*

PIC - Porcentagem de inibição do crescimento micelial

PIE - Porcentagem de inibição da esporulação

PIG - Porcentagem de inibição da germinação

POX - Peroxidase

ppm - Partes por milhão

QUI - Quitinase

s - segundo

SOD - Superóxido dismutase

sp. - Espécie não identificada

t - Tonelada

TR - Tempo de retenção

UR - Umidade relativa

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\gamma$  - Gama

$p$  - Para

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 Aspectos gerais sobre o cultivo do tomate.....	18
2.2 O patossistema e problemas fitossanitários do cultivo do tomate.....	19
2.3 Óleos essenciais como método alternativo para o controle de doenças de plantas.....	21
<b>2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS UTILIZADOS COMO BIOFUNGICIDAS</b>	
2.4.1 <i>Lippia sidoides</i> (Cham.) .....	22
2.4.2 <i>Lippia gracilis</i> (Schauer).....	23
2.4.3 <i>Mentha arvensis</i> L. ....	24
2.4.4 <i>Mentha piperita</i> L. ....	25
2.4.5 <i>Ocimum gratissimum</i> L. ....	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos.....	26
<b>4. METODOLOGIA</b>	
4.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	26
4.2 Obtenção dos isolados e teste de patogenicidade.....	27
4.3 Análise química dos óleos essenciais.....	27
4.4 Avaliações antifúngicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais no crescimento micelial dos isolados de <i>Corynespora cassicola</i> .....	28
4.5 Avaliações da produção conidial de <i>Corynespora cassicola</i> submetidos aos tratamentos com óleos essenciais.....	29
4.6 Avaliação dos óleos essenciais na germinação de conídios de <i>Corynespora cassicola</i> .....	30
4.7 Efeitos dos óleos essenciais na severidade da mancha-alvo em tomateiros em casa-de-vegetação.....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
5.1 Identificação dos componentes majoritários dos óleos essenciais.....	35
5.2 Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento micelial de isolado de <i>Corynespora cassicola</i> .....	42
5.3 Efeito dos óleos essenciais na produção e germinação de conídios de isolado de <i>Corynespora cassicola</i> .....	50

5.4 Efeito dos óleos essenciais na severidade da mancha-alvo em tomateiros.....	52
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) uma das hortaliças mais consumidas mundialmente, apresenta grande importância principalmente do ponto de vista econômico e nutricional (LI *et al.*, 2018). A China é o maior produtor mundial de tomate, seguida pela Índia, Estados Unidos, Turquia e Egito (FAO, 2019). O Brasil ocupa o oitavo lugar no ranking mundial, com produção média mensal de aproximadamente quatro milhões de toneladas, em 2020 (IBGE, 2021).

As enfermidades são os maiores desafios que limitam o cultivo dessa hortaliça em todo o mundo, não diferente na região Norte do Brasil. No estado do Amazonas a mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk e M. A. Curtis) C.T. Wei. é uma das doenças mais destrutivas do tomateiro. Devido às condições climáticas favoráveis, alta temperatura e umidade, o fungo vem causando epidemias severas nas lavouras, tanto em campo, quanto nos cultivos em áreas protegidas. Os sintomas da doença podem ser observados nas folhas, pecíolos e frutos da planta, de forma severa, inviabilizando a produção (GASPAROTTO *et al.*, 2019).

Não há, no Brasil, fungicida registrado para o controle da doença no cultivo do tomate, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa (2021), sendo necessário o uso de produtos indicados para outras doenças e culturas. Contudo, os possíveis danos provocados pela utilização de defensivos químicos, como fitotoxicidade, efeitos residuais e resistência do patógeno, já são bastante conhecidos (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004). Como opção para substituir o uso exacerbado de fungicidas, surge o controle alternativo de fitopatógenos, apresentando-se como uma forma promissora e bastante viável, visando um sistema agrícola sustentável.

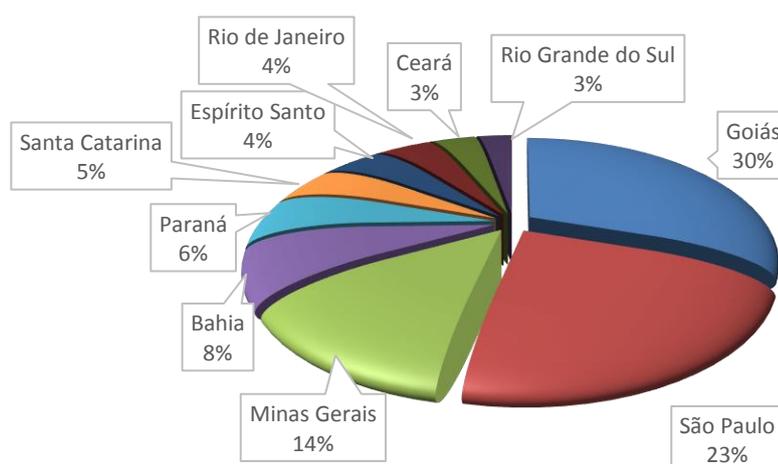
A diversidade de plantas medicinais, abre uma nova perspectiva com potencial de substâncias bioativas de interesse biotecnológico para controlar fitopatógenos (COSTA, 2018). Estudos sobre a atividade dessas espécies vegetais, têm avançado na agricultura, visando o controle ou o manejo de doenças causadas por microrganismos nas lavouras. Dentro desse contexto, este trabalho avaliou o potencial dos óleos essenciais de algumas espécies dos gêneros *Lippia*, *Mentha* e *Ocimum*, no controle da mancha-alvo do tomateiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O CULTIVO DO TOMATE

O tomate é um fruto de importância mundial, originário da região andina, na América do Sul (NAIKA, *et al.*, 2006). Esta espécie pertence à família Solanaceae, que também contém outras espécies bastante conhecidas, como a batata (*Solanum tuberosum* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.) e as pimentas (*Capsicum* spp). O tomateiro apresenta caule macio e redondo, com várias ramificações laterais (ALVES, 2020). O fruto apresenta-se em formato de baga, carnoso e com sementes, sendo uma rica fonte de vitaminas A ( $\beta$  caroteno), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B5 (niacina) e C, fibras, proteínas, carboidratos, minerais e possui baixo valor calórico (ALVARENGA e COELHO, 2013).

As cultivares comerciais são classificadas de acordo com as características dos frutos, sendo divididas em três grupos: Santa Cruz, salada e cereja. De acordo com o IBGE (2018), o Brasil é o oitavo maior produtor mundial dessa olerícola. A produção média mensal, em 2020, foi de 3,91 milhões de toneladas, sendo a produção do estado do Amazonas insuficiente para constar na estatística (IBGE, 2021). Entre os estados da região Norte do país, o Pará foi o que mais produziu tomate, cerca de 5,8 mil toneladas mensais, em 2020, enquanto que os maiores produtores por Unidade Federativa foram Goiás, São Paulo e Minas Gerais (Figura 1).



**Figura 1:** Ranking dos 10 maiores produtores de tomate por Unidade Federativa do país – ano 2020. Fonte: IBGE 2021

Segundo Fernandes (2016), o baixo nível tecnológico dos produtores e as condições ambientais favoráveis à ocorrência de pragas e doenças, são fatores responsáveis pela baixa produção da cultura do tomateiro no estado do Amazonas e a região ainda apresenta solos ácidos e pobres em nutrientes (LUZ *et al.*, 2002). Além disso, o tomateiro está predisposto ao ataque de vários fitopatógenos que podem limitar sua produção, entre eles o fungo *C. cassiicola* e a bactéria *Ralstonia solanacearum* Smith (1896) (Yabuuchi) *et al.*, 1995, agentes causais da mancha-alvo e da murcha bacteriana, respectivamente. Esses fitopatógenos são considerados os mais destrutivos para a cultura, na região Norte do País.

## **2.2 O PATOSSISTEMA E PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS DO CULTIVO DO TOMATE**

*Corynespora cassiicola* é um fungo Ascomycota mitospórico pertencente à classe Dothideomycetes (SCHOCH *et al.*, 2009). Devido a sua distribuição mundial, o fungo infecta uma gama de hospedeiras, que vão desde hortaliças, frutíferas e ornamentais a plantas invasoras (MENDES *et al.*, 1998; REIS e BOITEUX, 2007).

A ampla distribuição do patógeno no mundo, faz com que seja responsável por enormes prejuízos em lavouras de vários países, mais frequentemente nos trópicos. O primeiro relato de *C. cassiicola* em tomateiro foi em Serra Leoa (WEI, 1950) e, posteriormente, na Índia (MOHANTY e MOHANTY, 1955), na Austrália (SIMMONDS, 1958), nos Estados Unidos (BLAZQUEZ, 1972) e na Nigéria (BLISS *et al.*, 1973). No Brasil, os maiores prejuízos são relatados na Região Norte e no Estado do Maranhão (LOPES *et al.*, 2005). Foi detectado, pela primeira vez no país, em 1980, em cultivos de tomateiro no município de Manaus, Amazonas (ALVES *et al.*, 1985).

O fitopatógeno desenvolve-se bem em temperaturas variando de 20 °C a 32 °C e períodos de alta umidade relativa de 16 a 44 horas (JONES *et al.*, 2014), sendo que no tomateiro, a maior severidade da doença ocorre quando a temperatura é de aproximadamente 28 °C (PERNEZNY e SIMONE, 1999). O fungo consegue infectar tanto plantios em campo, como em cultivos protegidos (SCHLUB *et al.*, 2009).

Os sintomas ocorrem em diversas partes da planta e se iniciam com pequenas lesões na superfície das folhas (Figura 2), aumentando de tamanho, tornando-se circulares com coloração marrom-clara, rodeadas por halos amarelos (BLAZQUEZ, 1991). Em ramos e pecíolos as lesões são amarronzadas e alongadas, nos frutos jovens, os sintomas iniciais são caracterizados por pontuações marrom-escuras e circulares, que aumentam em

tamanho, tornam-se marrons com um centro mais claro, podendo rachar e formar “crateras” nos frutos. Nos frutos maduros (Figura 2), as lesões são marrons, circulares, com centro mais claro, e podem se romper, causando aberturas nos frutos (REIS e BOITEUX, 2007).

A ausência de fungicidas registrados para uso na cultura, juntamente com falta de pesquisas sobre o manejo da doença nas condições locais, inviabilizam o cultivo na região Norte do país (REIS e MADEIRA, 2009).



**Figura 2:** Sintomas de mancha-alvo, causadas por *Corynespora cassiicola*, em frutos (A) e em folha de tomateiro (B).

### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

De acordo com Nelson e Cox (2011), o conjunto de reações bioquímicas que acontecem nas células dos organismos vivos é conhecido como metabolismo celular, sendo o mesmo dividido em primário e secundário. Os óleos essenciais (OEs) são compostos naturais, originados a partir do metabolismo secundário das plantas (SILVA e CASALI, 2000). São substâncias ricas em terpenos e fenóis, voláteis e complexos, caracterizados por forte odor e tendo como precursores ácido chiquímico e acetil-CoA (MACHADO e JÚNIOR, 2011). Esses metabólitos atuam na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra herbívoros (BAKKALI *et al.*, 2008).

A composição química do OEs pode variar envolvendo uma série de compostos orgânicos como: terpenos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, cumarinas, ácidos, compostos organossulfurados, entre outros (GODINHO, 2011). Os terpenos mais abundantes são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15). A composição química de cada óleo depende da espécie em estudo, cultivar, partes do vegetal, da sua armazenagem e conservação e de fatores climáticos (MIRANDA *et al.*, 2016).

A efetividade dos OEs no controle de doenças em plantas está ligada à capacidade de penetrar na membrana plasmática do fungo, atuando de forma direta, promovendo danos irreversíveis às estruturas fúngicas e comprometendo sua integridade celular (RASOOLI *et al.*, 2006). Arroyo *et al.* (2007), verificaram por meio da microscopia eletrônica de transmissão, a desorganização e destruição de organelas e, eventualmente, a morte celular. A atividade biológica dos OEs pode ser sinérgica havendo uma participação combinada de moléculas em consequência de vários constituintes químicos dos óleos (ISMAN *et al.*, 2008). Em relação as concentrações mínimas inibitórias (CMI), a atuação do óleo varia dependendo do microrganismo (ANTUNES e CAVACOB, 2010).

Os constituintes dos OEs nas bactérias, têm ação oxidante, o que resulta no dano da membrana celular e, conseqüentemente, na perda de íons e conteúdo da célula, ocasionando a desnaturação de proteínas, inativação de enzimas celulares, seguido por morte das células bacterianas (BURT, 2004; SAAD, *et al.*, 2013; NIETO, 2017). Nos fungos, os OEs atuam desintegrando as hifas, devido aos compostos terpênicos, alcoólicos e fenólicos presentes, que são os responsáveis pela atividade antifúngica (PANDEY *et al.*, 2017). A atividade antifúngica dos óleos essenciais, segundo Bakkali

*et al.*, (2008) e Costa *et al.*, (2011), pode estar relacionada com sua propriedade hidrofóbica, o que significa que ao entrar em contato com o fungo, os componentes do óleo interagem com a mitocôndria e os lipídeos da membrana plasmática, alterando a sua permeabilidade e causam distúrbios estruturais, o que pode promover a exposição do conteúdo celular, inclusive do núcleo.

A ação dos OEs na bicamada fosfolipídica ocasiona inibição do transporte de elétrons e permeabilidade da membrana causando inchaço e reduzindo sua função (KNOBLOCH, *et al.*, 1986; DORMAN e DEANS, 2000). Rasooli *et al.* (2006), relataram alterações morfológicas, com a presença de hifas gravemente colapsadas, rompimento da membrana plasmática e destruição mitocondrial. Logo, o caráter lipofílico dos OEs lhes permite penetrar nas paredes celulares e afetar as enzimas envolvidas na síntese da parede celular, alterando as características morfológicas dos fungos e causando morte celular (COX *et al.*, 2000).

É presumido ainda, que os OEs sejam capazes de ativar, nas próprias plantas, mecanismos de defesa, os quais induzem a síntese de enzimas antioxidativas nas hospedeiras, atuando como importantes indutores de resistência às doenças (VELOSO, 2016), de forma similar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaicol peroxidase (GPOX), glutathione redutase (GR), peroxidases (POX) e quitinase (QUI) (GILL e TUTEJA, 2010). Devido a essa diversidade de substâncias encontradas nas plantas e suas propriedades antimicrobianas, Celoto *et al.* (2008) propõem que sejam realizados estudos sobre o potencial destas substâncias na agricultura.

## **2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS UTILIZADOS COMO BIOFUNGICIDAS**

### **2.4.1 *Lippia sidoides* (Cham.)**

*Lippia sidoides* ou alecrim-pimenta, como é popularmente conhecido, é um arbusto, pertencente à família Verbanaceae, próprio da vegetação nordestina brasileira, com casca frágil, folhas aromáticas e flores pequenas, atingindo até três metros de altura (MATOS e OLIVEIRA, 1998; LORENZI e MATOS, 2008; FONTENELLE, 2008).

O óleo essencial de *L. sidoides* possui como constituintes majoritários o timol,  $\rho$ -cimeno,  $\beta$ -cariofileno (SOARES, 2016). Ainda apresenta outros compostos, como o carvacrol, que possui forte atividade contra fungos, bactérias e ação larvicida (GOMES

*et al.*, 2011; FURTADO *et al.*, 2005; BOTELHO *et al.*, 2007; FONTENELLE *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

OLIVEIRA *et al.* (2008) utilizando a concentração de 0,3  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  verificaram que o OE de *L. sidoides*, inibiu o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus niger* Van Tieghem, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., e *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *ubenses* (E.f Snith) Snyd e Hans. Em estudo comparativo sobre a atividade antifúngica do OE de *L. sidoides* e dos compostos majoritários timol e carvacrol, contra espécies de *Candida albicans* (Robin) Berkhout, foi comprovado que os três exibiram potente atividade nas concentrações mínimas variando de 0,625  $\text{mg.mL}^{-1}$  a 10,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  (BOTELHO *et al.*, 2007). Em estudo, *in vivo*, para controlar a podridão peduncular de manga, causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon & Maublanc (sinônimo: *Botryodiplodia theobromae* Pat.), foi observado, na concentração 0,4  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , menor desenvolvimento de lesões (CRUZ *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 *Lippia gracilis* (Schauer)**

*Lippia gracilis* é uma espécie aromática originária do Nordeste brasileiro, sendo popularmente conhecida como alecrim-da-chapada, alecrim do serrote, alecrim de tabuleiro ou cidreira da serra (CAFFARO, 2014). Sua altura pode chegar a 2,5 m, apresenta folhas pequenas e flores brancas, ambas com odor bem característico (MARCELINO JR *et al.*, 2005). Geralmente, são dessas partes do tecido vegetal que se extrai o óleo essencial (CRUZ *et al.*, 2013).

A análise da composição química do OE de *L. gracilis* tem evidenciado o timol, o carvacrol e o p-cimeno, como componentes majoritários (MATOS *et al.*, 1999). Estudos têm demonstrado, para o OE de *L. gracilis*, atividade larvicida (SILVA *et al.*, 2008a), inseticida (PEREIRA *et al.*, 2008), antibacteriana (DANTAS *et al.*, 2010), acaricida (CRUZ *et al.*, 2013), anticancerígena (FERRAZ *et al.*, 2013) e antifúngica e antioxidante (FRANCO *et al.*, 2014). Componentes presentes no óleo de *L. gracilis*, como o timol e carvacrol, apresentaram atividade antifúngica envolvendo a inibição da biossíntese do ergosterol e causando lesões graves às membranas e paredes celulares dos fungos que resultaram na morte das células fúngicas (AHMAD *et al.*, 2011).

Avaliando a atividade antimicrobiana do OE de *L. gracilis* contra os fungos *Geotrichum candidum* Link e Pers., *Trichoderma viride* Pers., *Torula herbarum* (Pers. Link., *Paecilomyces* sp., *Fusicoccum* sp., *Aspergillus flavus* Link. e *A. niger*,

Albuquerque *et al.* (2006) observaram inibição no crescimento micelial nas concentrações a partir de 440  $\mu\text{L.L}^{-1}$  enquanto que, BARBOZA (2015), observou inibição total do crescimento de *Alternaria* sp. na concentração de 750  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . Ugulino *et al.* (2018), verificaram que o OE de *L. gracilis* inibiu em 100% o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., em todas as concentrações testadas (0,4; 0,6; 0,8; e 1%). Por outro lado, Costa-Carvalho (2011) estudando o efeito do OE de *L. gracilis* sobre o crescimento de *Thielaviopsis paradoxa* (De Seyn) Höhl não observou inibição no crescimento micelial nas concentrações de 0,2  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ; 0,5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ; 1,0  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  e 3,0  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ .

#### **2.4.3 *Mentha arvensis* L.**

*Mentha arvensis* pertence à família Lamiaceae também conhecida como menta japonesa e pimenta japonesa é uma espécie de interesse econômico, devido ao seu OE possuir várias aplicações industriais, sua origem é asiática, mas seu cultivo ocorre em todo o mundo (FREITAS *et al.*, 2004; DA SILVA e MELLO, 2021). O mentol é o composto majoritário do OE dessa espécie (PAULUS *et al.*, 2007).

Alguns estudos avaliando o efeito inibidor do OE desse vegetal contra microrganismos patogênicos vêm sendo desenvolvidos (DINIZ *et al.*, 2008). CHAUSSÊ *et al.* (2011) constataram que 0,75  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do óleo de *M. arvensis* foi eficiente na inibição do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer. Silva *et al.* (2012) verificaram que o OE de *M. arvensis*, na concentração de 100  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , inibiu o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium rubrum* Stoll, *Sclerotinia* sp., *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg e *C. cassicola* e PEIXINHO *et al.* (2017) observaram que o óleo essencial de *M. arvensis* foi capaz de inibir, em 100%, o crescimento micelial de *L. theobromae*, em todas as concentrações testadas (0,25%; 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%).

#### 2.4.4 *Mentha piperita* L.

*Mentha piperita*, conhecida popularmente como hortelã-pimenta, é uma erva aromática, com aproximadamente 30 a 90 cm de altura (MAHENDRAN; RAHMAN, 2020). A espécie é nativa da Europa, mas pode ser encontrada em todo o mundo, com ampla distribuição na América do Norte e África (SINGH *et al.*, 2015).

O OE de *M. piperita* é rico em mentona (14-32%) e mentol (30-50%) (CARDOSO *et al.*, 2001). A concentração dessas substâncias torna-se determinante para as propriedades bioativas do óleo essencial (SOUSA GUEDES *et al.*, 2016). Extrato e frações do OE de *Mentha piperita*, a 20 mg.mL<sup>-1</sup>, foram efetivos na inibição de *Pheritima posthuma* L. Vaillant (GIRME *et al.*, 2006). Extratos preparados com diclorometano e metanol de *M. piperita* demonstraram forte atividade contra espécies de leveduras do gênero *Candida* (HÖFLING *et al.*, 2010).

#### 2.4.5 *Ocimum gratissimum* L.

*Ocimum gratissimum*, pertence à família Lamiaceae, conhecido popularmente como alfavaca-cravo, é um subarbusto aromático, lenhoso, ereto, com até 1,0 m de altura, originário da Ásia e África e subspontâneo em todo território brasileiro (MARTINS, 2006).

O OE da parte aérea de *O. gratissimum*, analisado por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (CG/MS) JOSHI (2013), identificou o eugenol (75,1%) como o principal constituinte, compreendendo 99,3% do total do óleo. Padalia *et al.* (2014) encontrou 78,0% de eugenol na composição do OE.

O OE extraído dessa planta apresenta potencial atividade no controle de diversos microrganismos. Silva *et al.* (2005) demonstraram atividade, *in vitro*, contra fungos dermatófitos, em concentrações de 125 µg.mL<sup>-1</sup>. Avaliando a atividade do OE e extratos de *O. gratissimum* contra *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill, Lemos *et al.*, (2005) verificaram que o eugenol inibiu o crescimento do fungo na concentração de 0,9 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto Faria *et al.* (2006) verificaram inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Botryosphaeria rhodina* (Berk & M.A. Curtis) Arx. e de duas espécies de *Alternaria* spp., isolados de tomateiro.

### 3. OBJETIVOS

#### Geral

Avaliar o potencial fungitóxico dos óleos essenciais de *L. gracilis*, *L. sidoides*, *M. arvensis*, *M. piperita* e *O. gratissimum*, na inibição do fungo *C. cassiicola* e no controle da mancha-alvo em tomateiro.

#### Específicos

- ✓ Identificar os componentes majoritários dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS).
- ✓ Avaliar os efeitos *in vitro*, das diferentes concentrações dos óleos essenciais, sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de *C. cassiicola*.
- ✓ Avaliar os sintomas e o efeito *in vivo* dos óleos essenciais no controle da mancha-alvo do tomateiro, em casa de vegetação.

### 4. METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos em três etapas, a primeira, no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa, Amazônia Ocidental, a segunda no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (Inpa) campus III e a última em casa de vegetação no campus III do Inpa, todos em Manaus, AM.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a diferença entre as médias dos tratamentos, quando significativa, foi submetida a teste de separação de médias de Tukey a 5% utilizando os programas SISVAR e Excel.

#### 4.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Utilizaram-se neste trabalho, OEs de cinco espécies vegetais (*L. gracilis*, *L. sidoides*, *M. arvensis*, *M. piperita* e *O. gratissimum*) fornecidos pelo Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental. A obtenção dos OEs se deu por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Ao final da extração, os óleos foram armazenados em frascos de vidro âmbar. A massa foi registrada e, em seguida, armazenados sob refrigeração a 4 °C até o momento do uso.

## 4.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E TESTE DE PATOGENICIDADE

Neste estudo foi utilizado o isolado (Inpa 2672) de *C. cassiicola* pertencente à Coleção de Microrganismo de Interesse Agrossilvicultural do INPA, que se encontrava armazenado pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939). O método consiste na transferência de blocos de meio BDA, contendo os microrganismos, para um frasco com água esterilizada (COSTA e FERREIRA, 1991; DELLARETTI, 2014). O fungo foi reativado em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), preparado com a água do cozimento de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar, por litro de meio. Fragmentos de colônias dos isolados foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BDA e incubados por dez dias, a  $25 \pm 2$  °C, sob luz contínua, para estimular a produção de conídios.

Preparou-se uma suspensão de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *C. cassiicola*, através do método de pulverização foi inoculada 20 mL da suspensão no tecido foliar de cada muda sadia de tomateiro da cultivar 'Yoshimatsu', com 30 dias após a germinação. Nas testemunhas aplicou-se água destilada esterilizada. Posteriormente, as mudas foram mantidas em câmara úmida  $70 \pm 2$  UR% a  $30 \pm 2$  °C, por vinte e quatro horas, em casa-de-vegetação. Após 48 horas da inoculação realizou-se a avaliação da incidência da doença, nas mudas. A partir das lesões, foi realizado o isolamento direto do fungo, em meio BDA acrescido de 100 mg.L<sup>-1</sup> do antibiótico ampicilina (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Após o desenvolvimento das colônias do fungo em BDA, o patógeno foi submetido a identificação, utilizando microscópio óptico para confirmar o teste de patogenicidade.

## 4.3 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC-MS dos OEs (*L. sidoides*, *L. gracilis*, *M. arvensis*, *M. piperita* e *O. gratissimum*), utilizando um cromatógrafo de gás Trace Ultra acoplado ao sistema GC-MS Quadruplo Único Série ISQ™ e um espectrômetro de massa quadrupolo único (ambos da Thermo Scientific). Antes da injeção, o óleo volátil (1 mg) foi diluído em acetato de etila (1 mL).

Para cada amostra, 1 µL foi injetado com proporção de divisão de 1:50 para uma coluna capilar DB5/MS por TR-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do forno

foi programada de 60 a 240 °C, aumentando 3 °C min<sup>-1</sup>, usando hélio como gás de arraste e com uma injeção de temperatura a 240 °C e uma temperatura de interface de 250 °C. O espectrômetro de massa foi ajustado da seguinte forma: temperatura da fonte de íons, 220 °C; faixa de massa, m/z 40-600 e velocidade de varredura, 2 s. Utilizou-se o software Xcalibur v.2.2 para o controle e processamento dos dados de aquisição. A identificação do composto foi realizada comparando os espectros de massa obtidos, com os disponíveis em bibliotecas comerciais (NIST, ADAMS e biblioteca interna).

#### **4.4 AVALIAÇÕES ANTIFÚNGICAS *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS DE *Corynespora cassicola***

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia (Inpa) e conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5 x 6 (cinco óleos essenciais x seis concentrações), com cinco repetições, sendo cada placa de Petri, com uma cultura fúngica tratada com óleo essencial, uma unidade experimental. As análises dos resultados foram realizadas com auxílio do Programa Sisvar versão 5.3. Os valores foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os OEs das espécies *L. sidoides*, *L. gracilis*, *O. gratissimum*, *M. arvensis* e *M. piperita* foram utilizados nas concentrações: 1,2%, 1,0%, 0,7%, 0,5%, 0,2% e 0,0%, sendo esta última, o controle negativo. Os cálculos foram realizados para uma porção de 75 mL de meio de cultura BDA para cada tratamento. Em câmara de fluxo laminar, as concentrações específicas dos OEs foram adicionadas ao meio de cultura (BDA) fundente, com o emulsificante Tween 80 (0,5%). Posteriormente, em cada placa de Petri, foram vertidos 15 mL de meio de cultura com as respectivas concentrações dos OEs (SARMENTO-BRUM, 2012).

Um disco de 0,7 cm de diâmetro, contendo o micélio do isolado, retirado de colônia com 11 dias de crescimento, em meio de BDA, foi depositado, em posição invertida, no centro de cada placa de Petri, contendo meio BDA acrescido dos OEs. As placas foram então seladas com filme PVC (TOFFANO, 2010), identificadas e incubadas em estufa BOD, a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h (GRIGOLETTI JÚNIOR e LAU, 1999).

A atividade antifúngica *in vitro* dos OEs foi avaliada através da medição diária dos diâmetros (cm) das colônias, em dois sentidos perpendiculares entre si, tomando-se como

valor de crescimento a média das duas medidas (CHAGAS *et al.*, 2014) as avaliações iniciaram após 24 h de incubação.

A avaliação do efeito das diferentes concentrações dos OEs foi finalizada quando o crescimento micelial de pelo menos um dos tratamentos cobriu totalmente a superfície do meio de cultura (9 dias). Realizaram-se avaliações, calculando a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos OEs, em relação à testemunha, utilizando a fórmula de BASTOS (1997).

$$PIC = \frac{DTe - DTr}{DTe} \times 100$$

Onde:

PIC = Porcentagem de inibição do crescimento micelial.

DTe = Diâmetro da testemunha.

DTr = Diâmetro do tratamento.

#### **4.5 AVALIAÇÕES DA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *Corynespora cassiicola* SUBMETIDOS AOS TRATAMENTOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS**

A avaliação da produção de conídios foi realizada no Laboratório de Fitopatologia (Inpa) e conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 6 (cinco óleos essenciais e seis concentrações), com três repetições. As análises dos resultados foram realizadas com auxílio do Programa SISVAR versão 5.3. Os valores foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Após o término das avaliações de crescimento micelial, as colônias permaneceram, por mais dois dias, sob iluminação contínua fornecida por lâmpadas fluorescentes (luz branca 20W), localizadas 80 cm acima das placas, com o objetivo de induzir uma maior produção de conídios do fungo. Depois desse período, foi preparada uma suspensão de conídios, para cada tratamento, adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada às placas contendo os isolados de *C. cassiicola* e raspando-se cuidadosamente a superfície da colônia com lâmina de vidro, para liberação dos conídios SILVA (2015). Em seguida, ajustou-se o volume da suspensão para 20 mL.

Uma alíquota, de 50 µL, foi depositada em câmara de Neubauer espelhada e os conídios foram quantificadas, três vezes, em cada tratamento e calculada a média do número de conídios.mL<sup>-1</sup>. Foram contados todos os conídios presentes em cada gota nas 4 extremidades da câmara de Neubauer, com o auxílio do microscópio de luz sob objetiva de 40 x para obtenção do número de conídios.mL<sup>-1</sup> (BEZERRA, 2009).

A porcentagem de inibição da esporulação (PIE) foi obtida por meio da fórmula usada por Fernandes *et al.* (2015):

$$PIE = \frac{ETe - ETr}{ETe} \times 100$$

Onde:

PIE = Porcentagem de inibição da esporulação.

ETe = Esporulação da testemunha.

ETr = Esporulação do tratamento.

#### **4.6 AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Corynespora cassiicola***

Os testes da germinação de conídios foram realizados no Laboratório de Fitopatologia (Inpa) e conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 6 (cinco óleos essenciais e seis concentrações), com três repetições por tratamento. As análises dos resultados foram realizadas com auxílio do Programa SISVAR versão 5.3. Os valores foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Para verificar o efeito dos óleos essenciais na germinação de conídios, culturas obtidas do reisolamento do teste de patogenicidade de *C. cassiicola*, foram repicadas para meio de cultura BDA, em placas de Petri de 90 x 15 mm.

A quantificação da germinação dos conídios foi realizada em microscópio ótico com aumento de 400x. Alíquotas de 40 µL da suspensão 10<sup>6</sup> conídios.mL<sup>-1</sup> de *C. cassiicola* foram transferidas para cavidades de placas de ensaio imunoenzimático - ELISA. Em seguida, foram adicionados OEs nas diferentes concentrações. As placas ficaram mantidas em câmara úmida, em estufa, à 22 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 24 horas. Após esse período, foram adicionados 20 µL de lactofenol (REGENTE *et al.*, 1997) para paralisação da germinação dos conídios. Foram contados 100 conídios

por repetição e considerados germinados, quando o comprimento do tubo germinativo foi maior ou igual a largura do conídio (AMORIM *et al.*, 2011).

A porcentagem de germinação foi obtida por meio da fórmula usada por BRITO e NASCIMENTO (2015):

$$PIG = \frac{GTe - GTr}{GTe} \times 100$$

Onde:

PIG = Porcentagem de inibição da germinação.

GTe = Germinação da testemunha.

GTr = Germinação do tratamento.

#### **4.7 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA SEVERIDADE DA MANCHA-ALVO, EM TOMATEIROS, EM CASA-DE-VEGETAÇÃO**

O experimento foi instalado no Inpa, em casa-de-vegetação, com laterais abertas, com cobertura de filme de polietileno transparente, e conduzidas no período de outubro a novembro de 2019, em delineamento inteiramente casualizado, com treze tratamentos e cinco repetições, totalizando 65 unidades experimentais. As análises dos resultados foram realizadas com auxílio do Programa SISVAR versão 5.3. Os valores foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Mudas da cultivar 'Yoshimatsu' foram produzidas em copos plásticos, com capacidade de 180 mL, semeando-se duas sementes, por recipiente, contendo substrato para Plantimax HT® (BEZERRA, 2009). A irrigação foi realizada duas vezes ao dia. Sete dias após a germinação, realizou-se o desbaste das plântulas deixando-se uma planta em cada copo (BEZERRA, 2009).

Decorridos 26 dias da germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de plásticos, com a capacidade de 5 L, contendo mistura de terriço e esterco de galinha bem curtido, na proporção de 4:1, sob irrigação diária. Os vasos foram distribuídos inteiramente ao acaso, no experimento.

Decorrido 12 dias do transplante, foi realizada a primeira aplicação dos óleos essenciais (Figura 3) utilizando o método de pulverização, de forma a ativar mecanismos de defesa das plantas. Os tratamentos avaliados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Dosagens de óleos essenciais utilizadas para avaliar o efeito na severidade da mancha-alvo em tomateiro, utilizando o método de pulverização.

<b>Tratamentos</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Dosagem aplicada (mL)</b>
T1: <i>Lippia sidoides</i>	0,2	30
T2: <i>Lippia sidoides</i>	1,0	30
T3: <i>Lippia gracilis</i>	0,2	30
T4: <i>Lippia gracilis</i>	1,0	30
T5: <i>Mentha piperita</i>	0,2	30
T6: <i>Mentha piperita</i>	1,0	30
T7: <i>Mentha arvensis</i>	0,2	30
T8: <i>Mentha arvensis</i>	1,0	30
T9: <i>Ocimum gratissimum</i>	0,2	30
T10: <i>Ocimum gratissimum</i>	1,0	30
T11: controle negativo	água destilada	30
T12: controle negativo	suspensão de conídios $10^6$	30
T13: controle positivo	Fungicida Carbendazim	0.8 á 1 L p.c.ha

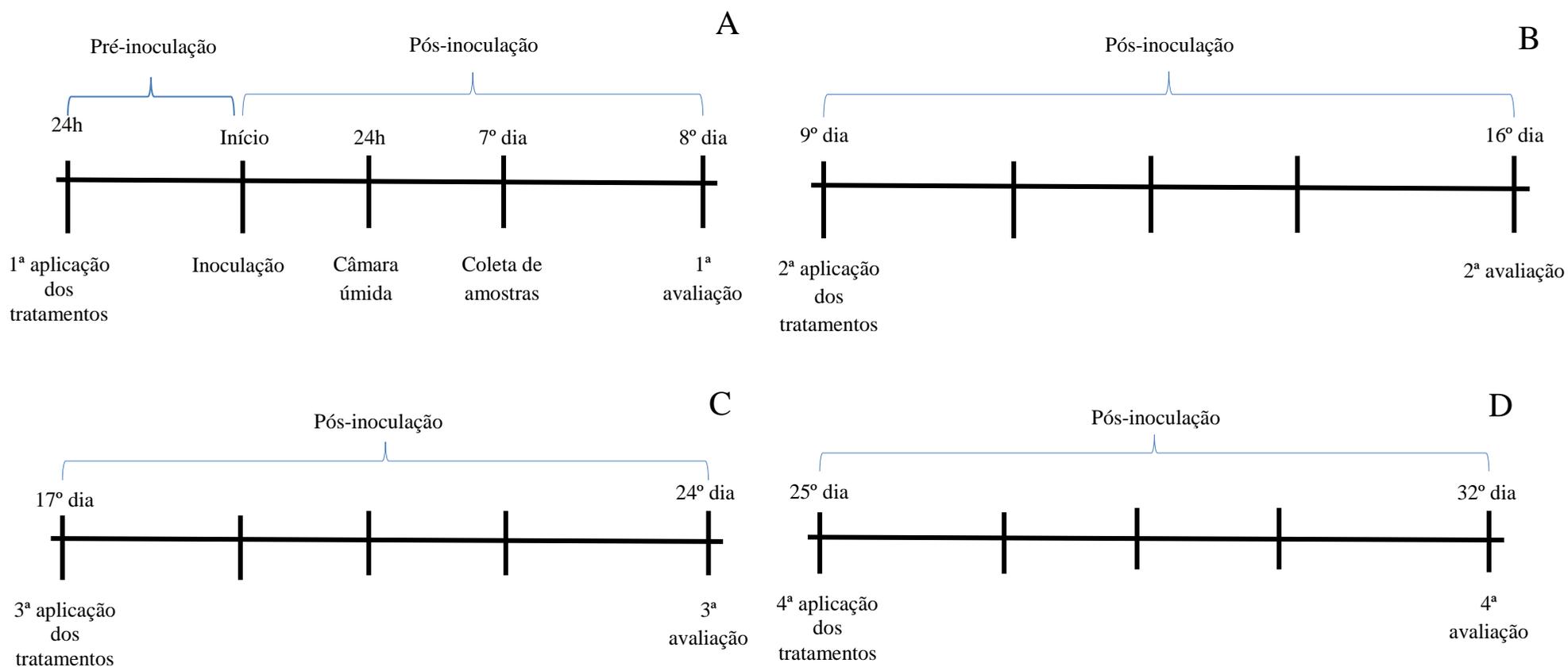
Para preparação da suspensão de conídios utilizaram-se colônias de *C. cassicola* obtidas do reisolamento do teste de patogenicidade, com 10 dias de cultivo em meio BDA. Para preparar a suspensão, adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, foi raspada a superfície da colônia, para a liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e ajustada para  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Os OEs foram diluídos em água destilada esterilizada (180 mL), para as concentrações de cada tratamento com adição de agente emulsificante (Tween 80 a 0,5%).

Após 48 h da primeira aplicação dos óleos, foi realizada a inoculação do patógeno (Figura 3), utilizando um pulverizador manual e aplicando a suspensão de conídios em toda a parte aérea da planta, até o ponto de escorrimento. As mudas permaneceram em câmara úmida, preparada com saco plástico transparente, por 24 h. Após quatro dias,

amostras foliares foram coletadas e levadas ao laboratório para observação dos sinais do patógeno sob microscópio estereoscópico.

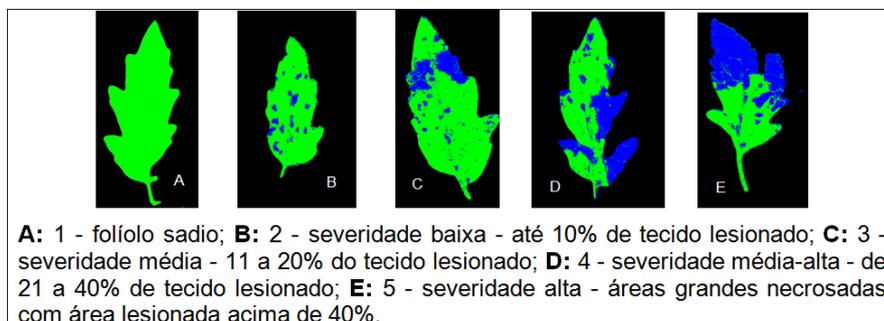
Os tratamentos com os OEs foram repetidos, semanalmente, cobrindo toda parte aérea das plantas, aplicados com o auxílio de pulverizador manual, durante 32 dias, totalizando quatro aplicações. Aproximadamente 30 mL da emulsão de óleo essencial foram aplicados em cada planta, em cada aplicação.

As avaliações foram realizadas semanalmente, no período da manhã, totalizando quatro avaliações (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema das atividades realizadas no experimento de avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre a severidade da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) em tomateiro.

A severidade (%) da doença foi avaliada nas folhas de todas as unidades experimentais. Foi utilizada uma escala diagramática (Figura 4) composta de cinco níveis de severidade, adaptada de COSTA (2012).

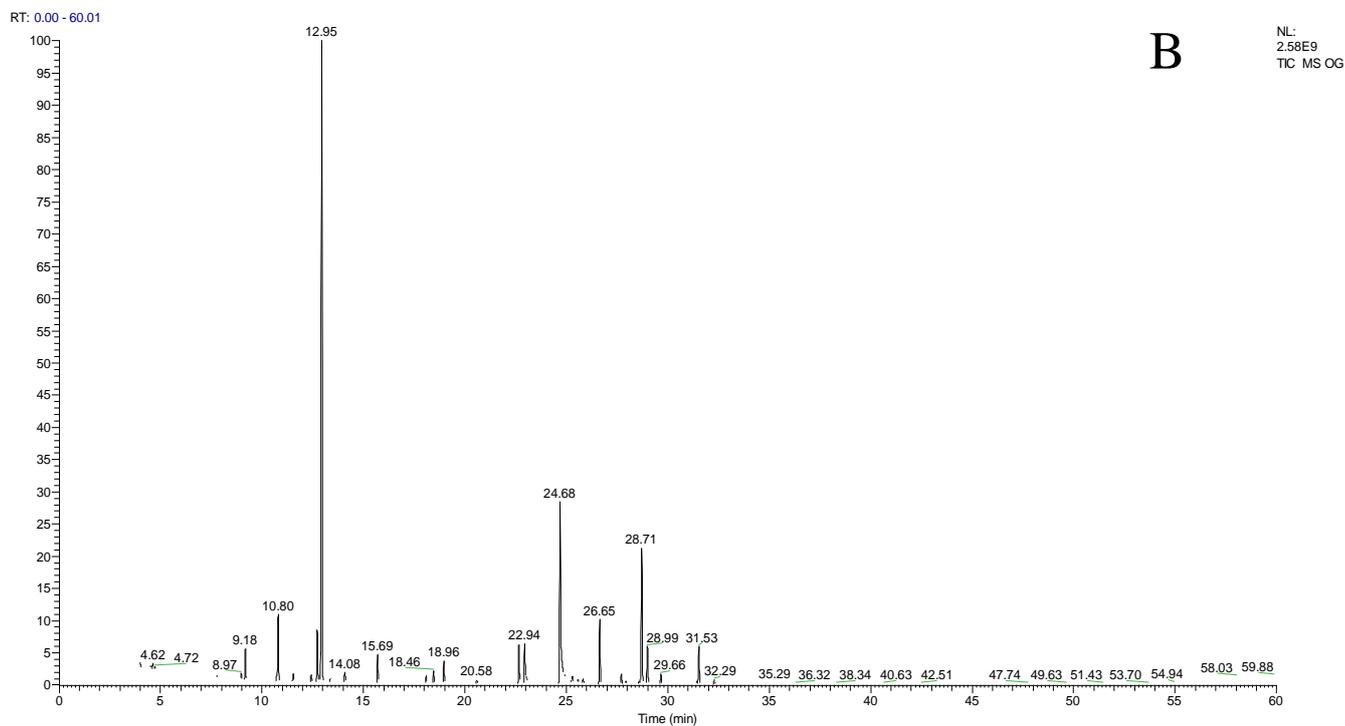
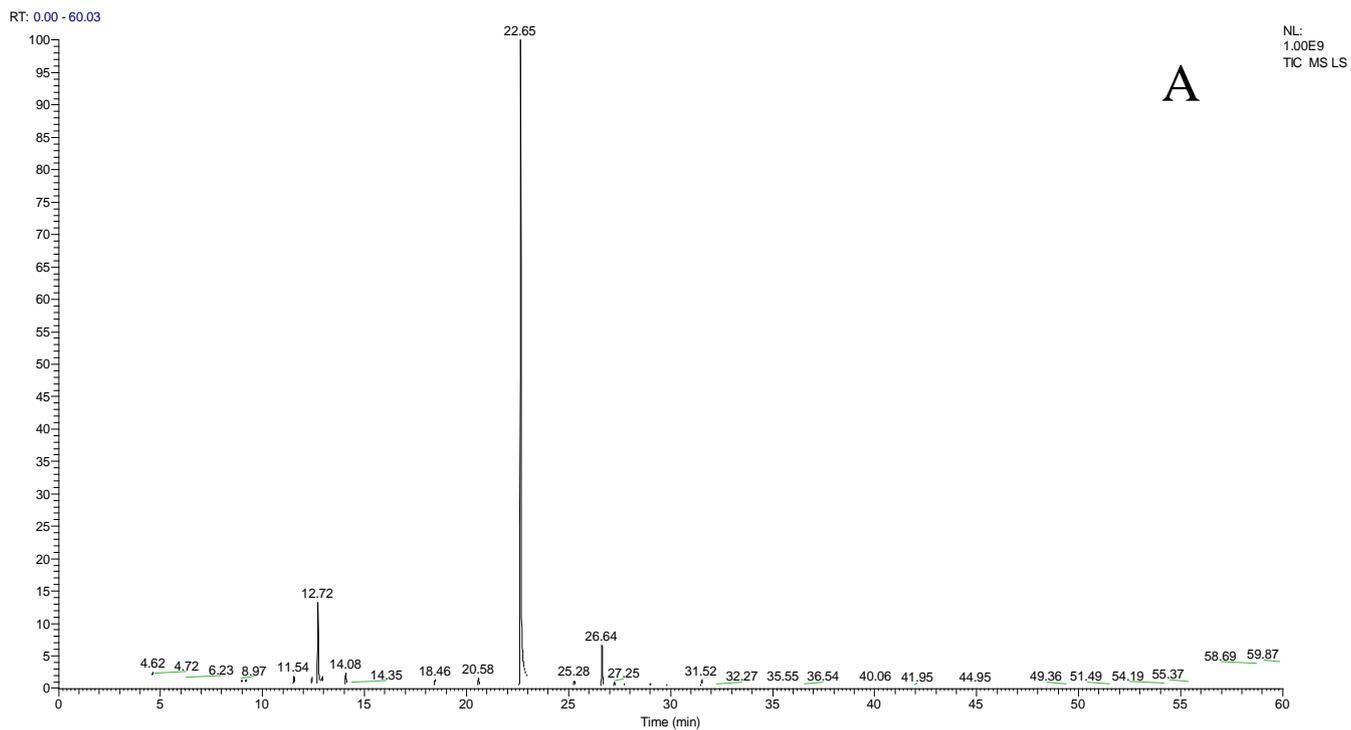


**Figura 4:** Escala de notas para avaliação da severidade de mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) em folíolos de tomateiro. Adaptado por COSTA (2012).

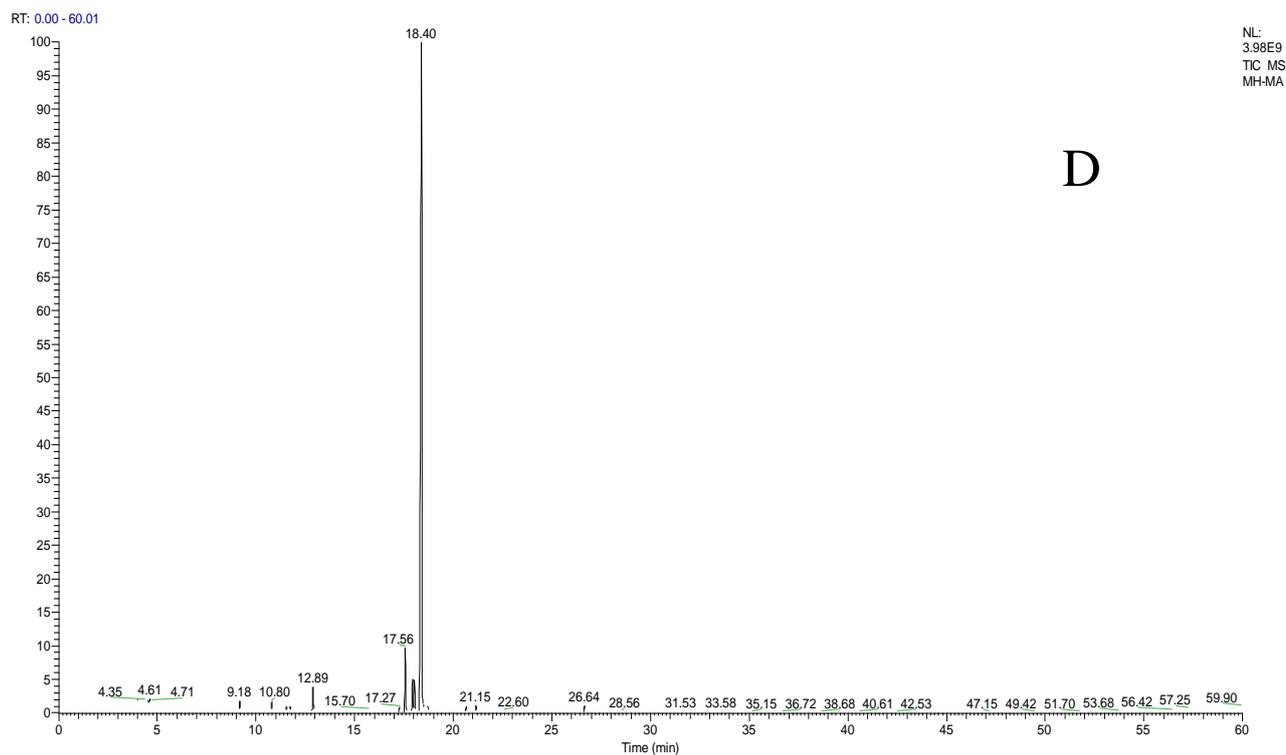
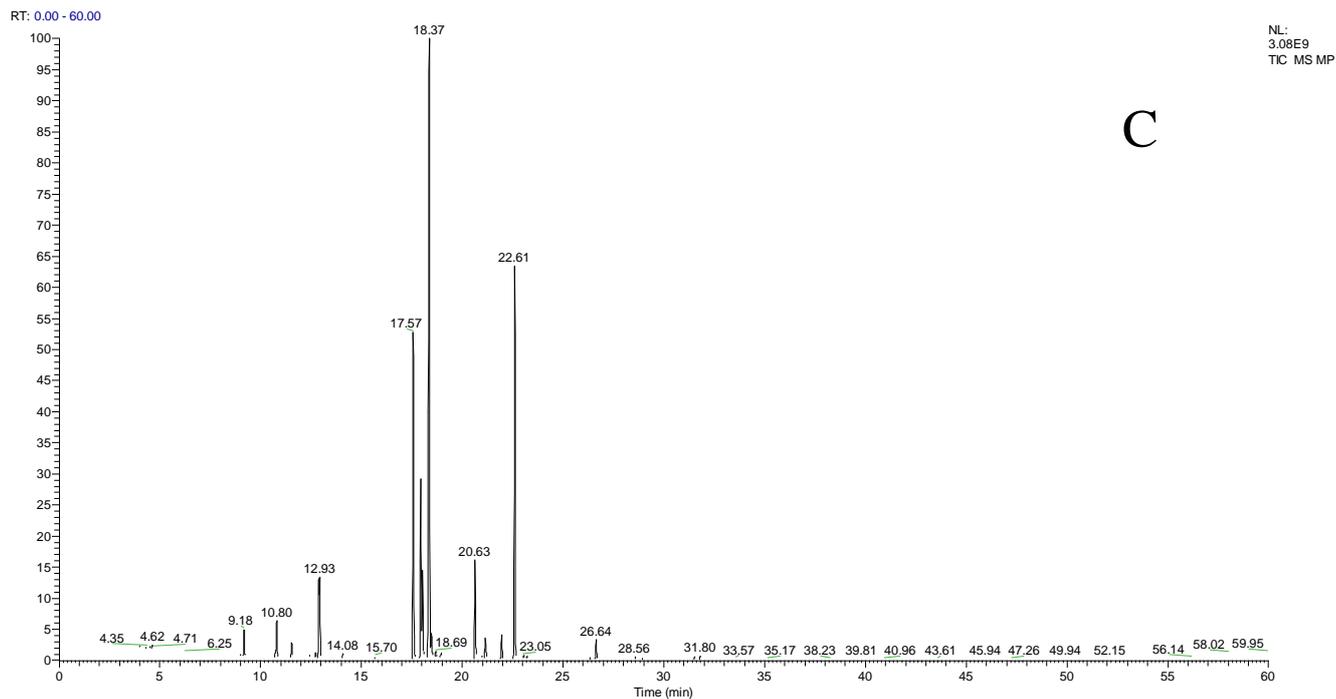
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os fitoconstituintes nos óleos essenciais foram identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A constituição química, os tempos de retenção, índices de retenção calculados e tabelados e os teores em porcentagem (calculados por normalização de áreas) para cada OE encontram-se nas Tabelas 2 a 5 e nas Figuras 5 e 6 são apresentados os perfis cromatográficos dos OEs.



**Figura 5:** Perfis cromatográficos dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (A) e de *Ocimum gratissimum* (B).



**Figura 6:** Perfis cromatográficos dos óleos essenciais de *Mentha piperita* (C) e de *Mentha arvensis* (D).

O OE de *L. sidoides* apresentou como constituinte majoritário o fenol timol (89,1%) (Tabela 2). Outros compostos também foram detectados, porém, em percentuais inferiores.

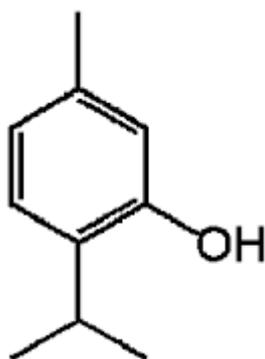
**Tabela 2:** Composição química (%) do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.

Composto	TR (min)	IK Lit.	IK Calc.	(%)
p-cimeno	12,72	1020	1021	6,34
Timol	22,65	1290	1192	89,1
$\beta$ -cariofileno	26,64	1419	1314	4,53
<b>TOTAL</b>				99,97

TR – Tempo de Retenção, na coluna TR5, de acordo com Adams (2017); IK Lit. - Índice Kovats encontrados na literatura (Adams); IK Cal. - Índice Kovats calculados; % - porcentagem

Análises fitoquímicas do OE de *L. sidoides*, realizadas em estudos anteriores, também revelaram o timol como constituinte majoritário. A estrutura molecular do timol está apresentada na Figura 7. Veras *et al.* (2014) observaram teor de 84,9% de timol no OE de *L. sidoides*, seguido por p-cimeno (5,33%) e etil metil carvacrol (3,01%). Morais (2014), encontrou, no OE de *L. sidoides* 61,59% de timol, seguido por 9,08% de (E)-cariofileno e de 8,94% de p-cimeno. Brito *et al.* (2015), encontraram o 84,95% de timol, seguido por p-cimeno (5,33%), éter metil carvacrol (3,01%), 1,8-cineol (1,68%),  $\gamma$ -terpineno (1,31%),  $\beta$ -cariofileno (1,17%) e carvacrol (0,41%). Resultados similares aos encontrado neste estudo. Por outro lado, Oliveira (2019), estudando os constituintes majoritários do OE de *L. sidoides* encontrou os teores de 29,99% de p-cimeno, 14,55% de timol, 13,18% de cineol, 12,52% de cariofileno e 6,68% de p-Mentha-1,3,8-trieno.

A principal justificativa da variação dos constituintes majoritários do OE, está ligada a fatores genéticos da espécie, além da influência dos fatores edafoclimáticos, da forma de extração dos OEs e da parte da planta que está sendo analisada. Cezarotto (2009), afirma que altas temperaturas, o ritmo circadiano, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta são fatores que podem explicar a variação nos teores dos constituintes do OE.



**Figura 7:** Estrutura molecular do fenol timol, principal constituinte do óleo essencial de *Lippia sidoides* (FLAMINI, 2012)

Em *O. gratissimum* os componentes majoritários encontrados foram, óxido 1,8-cineol (47,9%) e fenol eugenol (17,7%) (Tabela 3). A estrutura molecular dos compostos majoritários está apresentada na Figura 8.

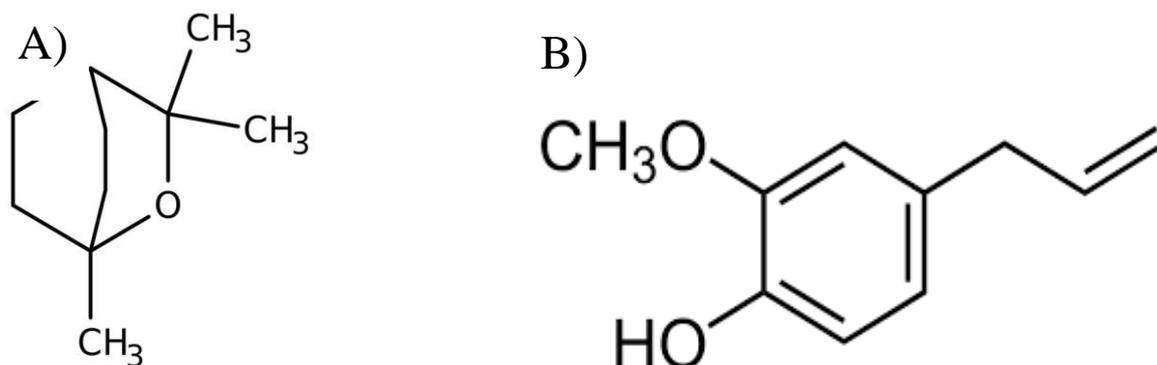
**Tabela 3:** Composição química (%) do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L., determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.

Composto	TR (min)	IK Lit.	IK Calc.	(%)
$\alpha$ -pineno	9,18	932	930	1,55
$\beta$ -pineno	10,8	974	972	4,08
o-cimeno	12,72	1026	1021	3,6
1,8-cineol	12,95	1031	1027	47,9
Linalol	15,69	1096	1097	2,03
$\alpha$ -terpineol	18,96	1188	1186	1,63
Timol	22,66	1290	1292	2,91
Carvacrol	22,96	1299	1301	1,11
Eugenol	24,68	1359	1353	17,7
$\beta$ -cariofileno	26,65	1419	1414	4,94
$\beta$ -selineno	28,71	1490	1479	10,1
$\alpha$ -selinene	28,99	1498	1488	2,45
<b>TOTAL</b>				<b>100</b>

TR – Tempo de Retenção, na coluna TR5, de acordo com Adams (2017); IK Lit. - Índice Kovats encontrados na literatura (Adams); IK Cal. - Índice Kovats calculados; % - porcentagem

Análises fitoquímicas do OE de *O. gratissimum* realizadas por diferentes autores, confirmam a presença dos mesmos compostos majoritários encontrados neste trabalho. Mohr *et al.* (2017), avaliando a composição do OE de *O. gratissimum*, detectaram via

GC-MS, o linalol (32,9%) e 1,8-cineol (21,9%). Alvarenga (2018), identificou o eugenol (89,42%) como constituinte majoritário em folhas frescas. Melo *et al.* (2019), identificaram 19 compostos na amostra, sendo o mais abundante eugenol (74,83%), seguido por 1,8-cineol (15,16%).



**Figura 8:** Estrutura molecular do óxido 1,8-cineol (A), segundo Flamini (2012), e do fenol eugenol (B), segundo Gazolla et al. (2018), principais constituintes do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*.

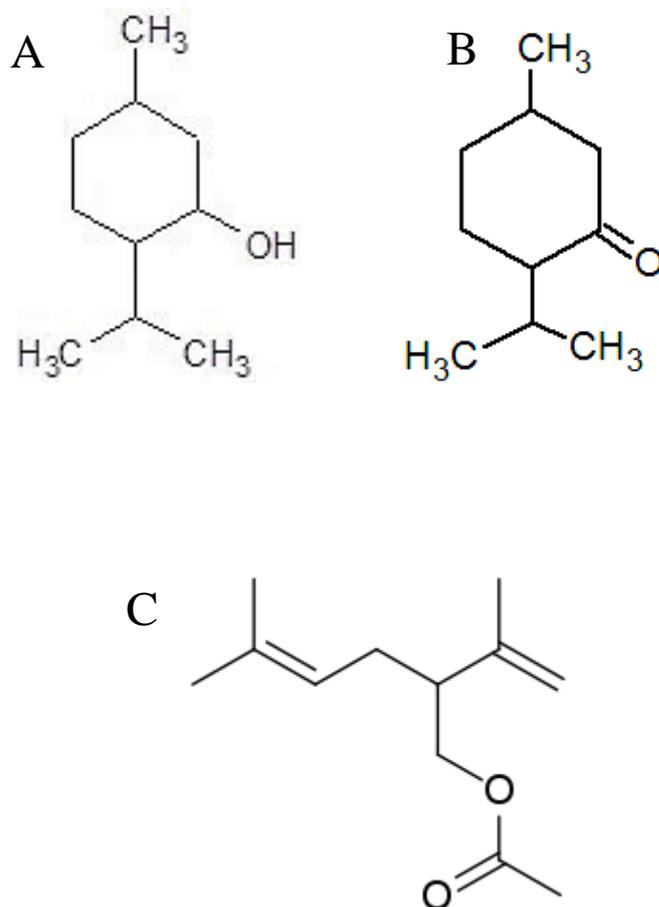
Para a espécie *M. piperita* foram identificados como componentes majoritários, o monoterpenol mentol (38,3%), o éster acetato de lavandulil (20,5%) e a cetona mentona (16,4%) (Tabela 4). Suas estruturas moleculares encontram-se na Figura 9.

**Tabela 4:** Composição química (%) do óleo essencial de *Mentha piperita*, determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.

Composto	TR (min)	IK Lit.	IK Calc.	(%)
$\alpha$ -pineno	9,18	932	930	1,00
$\beta$ -pineno	10,8	974	972	1,38
Menteno <3-p->	11,54	987	991	0,59
Limoneno	12,93	1029	1026	7,07
Mentona	17,57	1152	1148	16,4
Menthofuran	17,95	1164	1159	7,41
<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	18,03	1170	1161	2,01
Mentol	18,37	1171	1170	38,3
Pulegona	20,63	1237	1234	4,5
Butanoato de octeno-3-ol <1->	21,95	1282	1272	0,84
Acetato de lavandulil	22,61	1290	1291	20,5
<b>TOTAL</b>				100

TR – Tempo de Retenção, na coluna TR5, de acordo com Adams (2017); IK Lit. - Índice Kovats encontrados na literatura (Adams); IK Cal. - Índice Kovats calculados; % - porcentagem

Os resultados obtidos coincidem com os já descritos para o OE de *M. piperita*. Guedes *et al.*, (2016), identificaram, como constituintes majoritários, do OE, o mentol (56,85%) e Iseppi *et al.*, (2020), a mentona (7,8%). Hsouna *et al.* (2019) encontraram o mentol (33,59%) e isso-mentona (33,00%) como constituintes majoritários.



**Figura 9:** Estrutura molecular do mentol (A), da mentona (B), segundo Flamini (2012), e do acetato de lavandulil (C), segundo Hamilton *et al.* (2005), principais constituintes do óleo essencial de *Mentha piperita*.

O principal componente detectado no OE de *M. arvensis* foi o monoterpénol mentol (89,8%) (Tabela 5). Sua estrutura molecular encontra-se na Figura 9a.

**Tabela 5:** Composição química (%) do óleo essencial de *Mentha arvensis* determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS, tempos de retenção e índices de Kovats.

Composto	TR (min)	IK Lit.	IK Calc.	(%)
Limoneno	12,88	1029	1025	1,68
Mentona	17,56	1152	1148	4,6
Isso mentona	17,93	1162	1158	2,18
Mentol <neo->	18,03	1165	1161	1,71
Mentol	18,4	1171	1141	89,8
<b>TOTAL</b>				99,97

TR – Tempo de Retenção, na coluna TR5, de acordo com Adams (2017); IK Lit. - Índice Kovats encontrados na literatura (Adams); IK Cal. - Índice Kovats calculados; % - percentagem

Os resultados obtidos, em relação à composição do OE de *M. arvensis*, estão de acordo com os já descritos na literatura. Brito (2007), avaliando a composição química do OE de *M. arvensis*, por CG-MS, encontrou o mentol (51,32%) e o acetato de mentila (6,15%) como constituintes majoritários. Manh e Tuyet (2020), identificaram como constituintes majoritários, o mentol (66,04%), o metil acetato (22,19%), a mentona (2,51%) e o limoneno (2,04%).

## 5.2 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADO DE *Corynespora cassiicola*

Dos OEs avaliados sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*, apenas o OE de *M. piperita* (0,2%) não teve efeito na inibição do crescimento micelial, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nas demais concentrações e OEs verificou-se inibição total do crescimento micelial (Tabela 6).

**Tabela 6:** Índice de crescimento micelial (ICM) de *Corynespora cassiicola*, cultivado em meio BDA contendo diferentes concentrações de óleos essenciais, durante 9 dias.

[%] OE	Índice de crescimento micelial (cm.dia <sup>-1</sup> )				
	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Lippia gracilis</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>
0,0	1,56 a	1,56 a	1,56 a	1,56 a	1,56 a
0,2	0,24 b	0,23 b	0,78 a	0,26 b	0,39 b
0,5	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
0,7	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

1,0	0,00 b				
1,2	0,00 b				
CV (%)	11,97				

Valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todos os OEs testados, e concentrações utilizadas apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*. No entanto, somente a partir da concentração 0,5% houve inibição total do crescimento micelial do patógeno, com valores de diâmetro da colônia de 0,70 cm (Tabela 7). Mostrando que quanto maior for a dosagem aplicada, maior será a atividade fungicida do óleo essencial. No tratamento controle sem adição de OE, o crescimento micelial foi superior a 7,70 cm de diâmetro (Tabela 7).

**Tabela 7:** Diâmetro da colônia (cm) de *C. cassiicola*, cultivado em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleos essenciais, durante 9 dias.

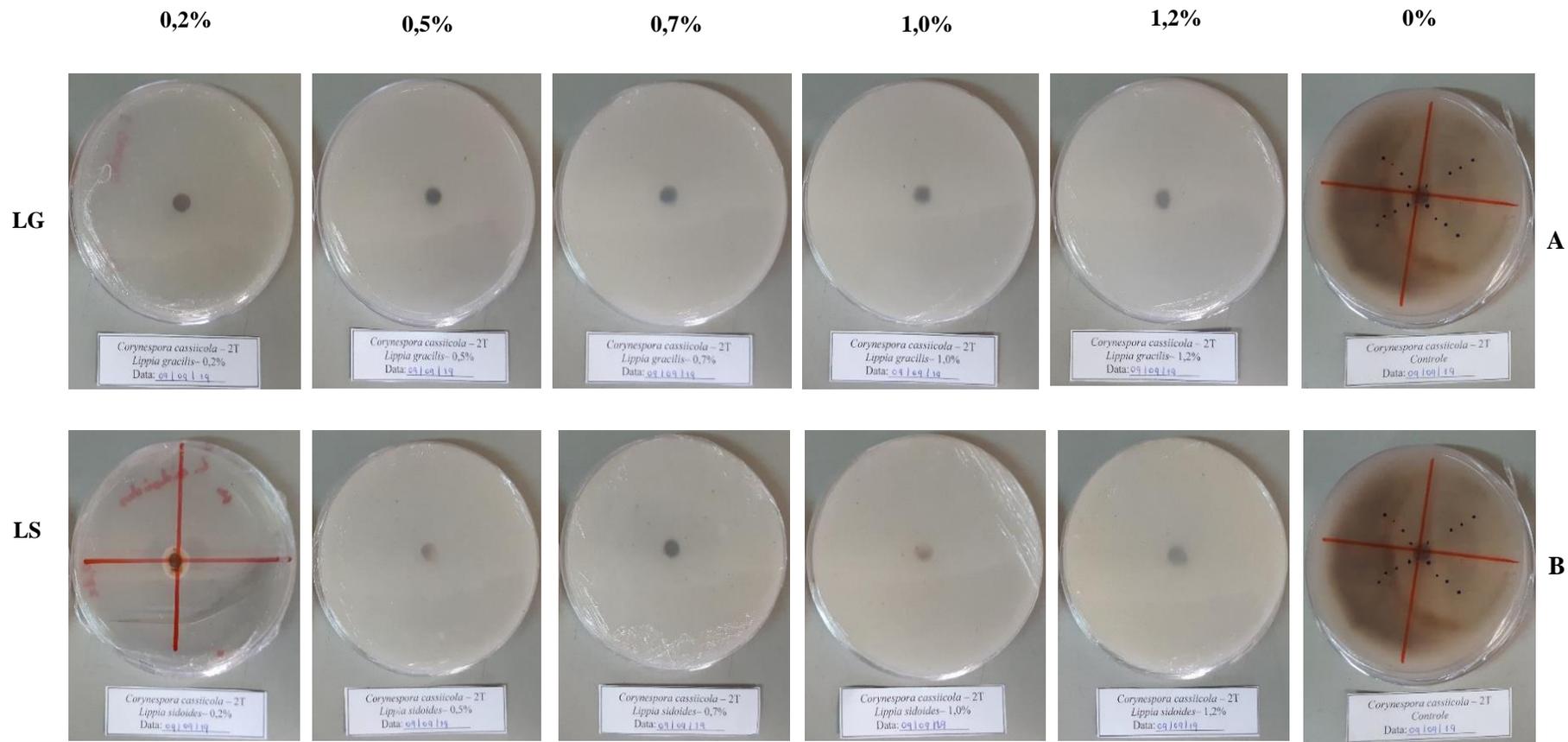
[%] OE	Diâmetro da colônia (cm)				
	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Lippia gracilis</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>
0,0	7,79 a				
0,2	1,23 b	1,17 b	3,90 b	1,32 b	1,93 b
0,5	0,70 c				
0,7	0,70 c				
1,0	0,70 c				
1,2	0,70 c				
CV (%)	16,81				

Valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A presença dos metabolitos fenólicos (timol e carvacrol) no OE de *L. gracilis* pode explicar a inibição do crescimento micelial (Figura 10a) de *C. cassiicola* cultivado em meio BDA contendo OE de *L. gracilis* nas concentrações a partir de 0,5%. Numpaque *et al.* (2011), investigando por 10 dias a ação do timol sobre os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum* Simmonds e *L. theobromae* e observaram que o timol, na concentração de 150 µg.mL<sup>-1</sup> e em concentrações superiores, inibiu totalmente o crescimento micelial de ambos os fungos. Almeida *et al.* (2010), constataram que o timol, em concentrações a

partir de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. cassiicola*. Romero *et al.* (2013), observaram que o monoterpene carvacrol inibiu completamente o crescimento micelial de *C. cassiicola*, nas concentrações de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Romero *et al.* (2013), esclarecem que os monoterpenos timol e carvacrol possuem atividade antimicrobiana contra amplo espectro de microrganismos. Já a atividade antifúngica pode ser explicada, segundo Zambonelli *et al.* (1996), pela degeneração das hifas, que causa a liberação do conteúdo celular. Acredita-se, que o potencial antimicrobiano de compostos fenólicos, como o carvacrol e o timol, se deva à presença de um grupo hidroxila (OH) no anel fenólico, que lhes confere um alto poder reativo.

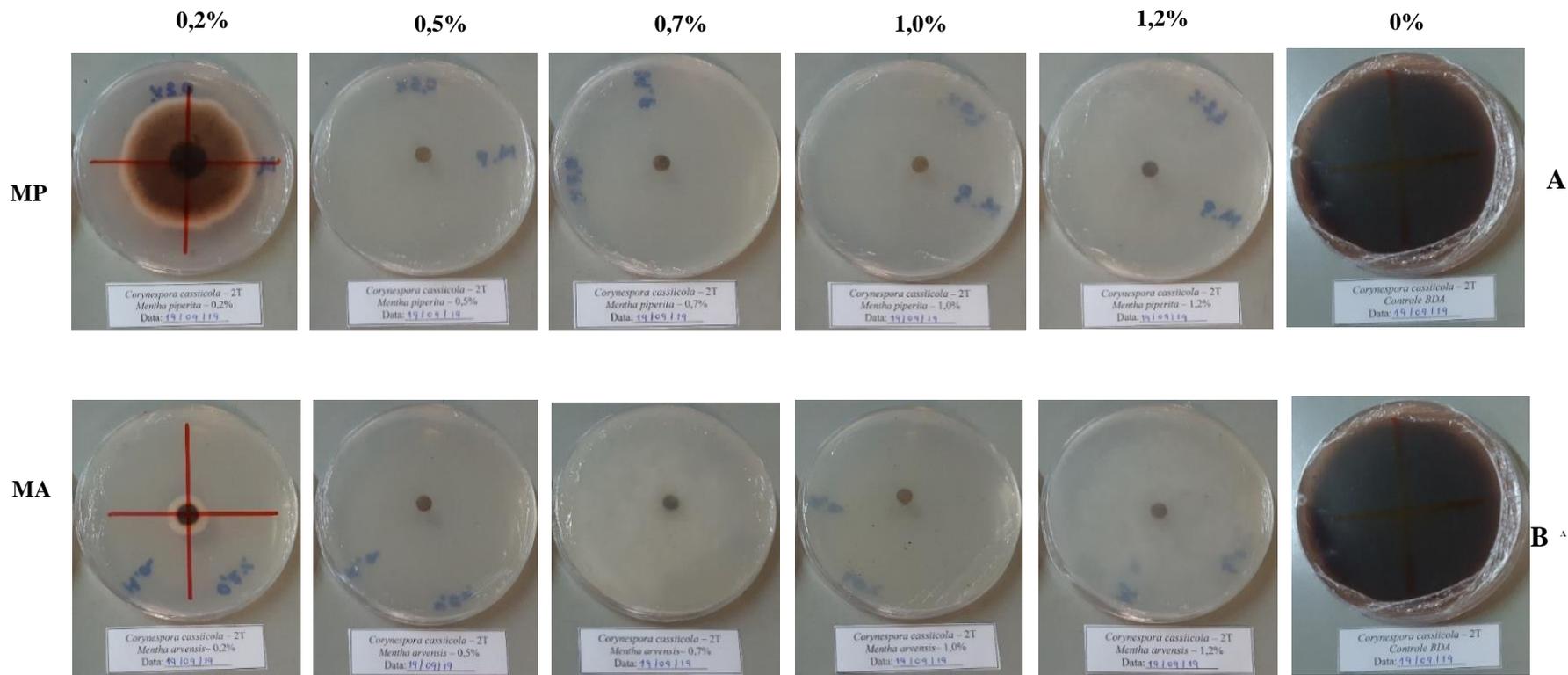
Os compostos bioativos presentes em *L. sidoides*, dentre os quais os majoritários (timol, para-cimeno e beta-cariofileno), podem ser os principais responsáveis pela destacada atividade antimicrobiana, capaz de inibir o crescimento micelial (Figura 10b) de *C. cassiicola* em até 100% nas concentrações de 375  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e superiores. Marei *et al.* (2012) investigando a ação de 12 monoterpenos, sobre o crescimento micelial de quatro espécies de fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani* Kuhn, *F. oxysporum*, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. e *A. niger*), concluíram que o composto de maior eficácia foi o timol. Em estudo realizado por Brito *et al.* (2015), tanto o OE de *L. sidoides* quanto o timol, tiveram efeito fungicida sobre cepas de *Candida* spp., sendo a concentração fungicida mínima de 128 a 512  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para o OE, enquanto para o timol, a concentração fungicida mínima variou entre 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 10:** Crescimento micelial do fungo *Corynespora cassiicola* em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleos essenciais de *Lippia sidoides* (LS) e *Lippia gracilis* (LG), após nove dias de cultivo, à temperatura ambiente e sob luz contínua.

O OE de *M. arvensis* demonstrou eficiência inibindo o crescimento micelial de *C. cassiicola in vitro* (Figura 11a). Os resultados são promissores e coloca o óleo dessa espécie como forte candidato para ser usado no controle doença em campo, o que pode viabilizar e agregar maiores resultados no produto final, pois fará uso de um controle natural que não agride o meio ambiente e nem causa danos no produto, e conseqüentemente ao consumidor. A atividade antifúngica desse óleo vem sendo demonstrada em diversos estudos. Diniz *et al.* (2008) investigando, *in vitro*, a atividade antifúngica do OE de *M. arvensis*, nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{L}$  contra os patógenos *Aspergillus sp.*, *P. rubrum*, *Sclerotinia sp.*, *F. verticillioides* e *C. cassiicola*, constataram que no tratamento com 0,1%, todos os fungos em estudo sofreram ação fungicida do OE de menta que variaram de 80% a 100% de inibição do crescimento micelial.

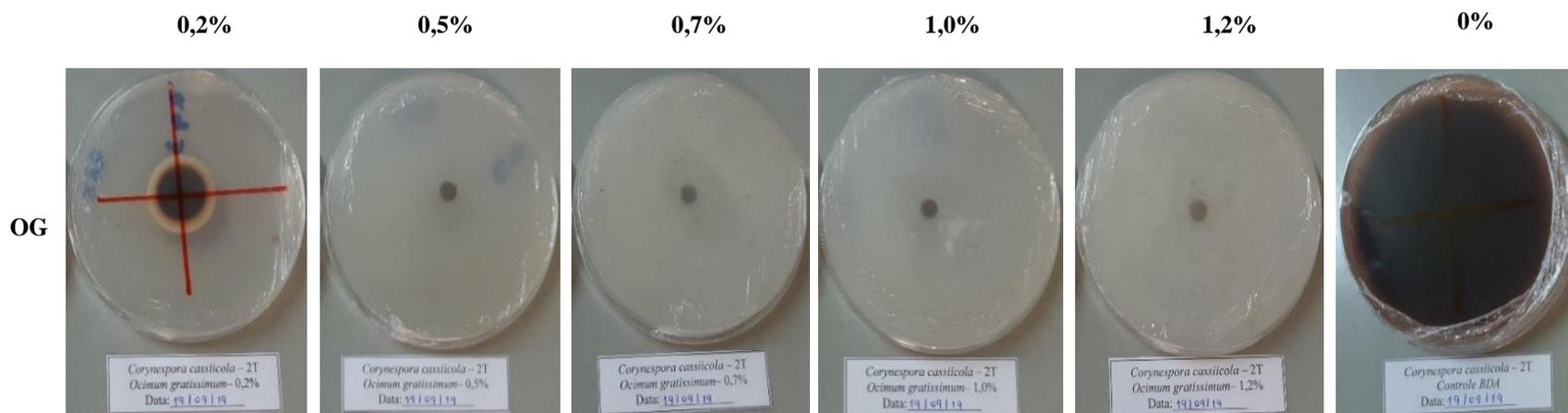
Os produtos do metabolismo secundário de *M. piperita*, que tem como componentes majoritários mentol, mentona, metil acetato e pulegona possuem ação inibitória capaz de cessar o crescimento micelial de *C. cassiicola in vitro* (Figura 11b). Romero (2013), observou a ação de dois desses monoterpenos, no crescimento micelial de *C. cassiicola*, nas concentrações 250; 500; 1000 e 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  obtendo inibição completa para o monoterpeno mentona no crescimento micelial nas duas maiores concentrações utilizadas, para o mentol, os resultados foram semelhantes, obtendo completa inibição do crescimento micelial nas maiores concentrações.



**Figura 11:** Crescimento micelial do fungo *Corynespora cassicola*, em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita* (MP) e *M. arvensis* (MA), após nove dias de cultivo, à temperatura ambiente e sob luz contínua.

Os compostos bioativos majoritários (eugenol, 1,8-cineol,  $\beta$ -selineno, trans-cariofileno e cis-ocimeno) presentes em *O. gratissimum*, apresentaram atividade inibitória para o crescimento micelial de *C. cassiicola* (Figura 12). Essa ação direta do OE de *O. gratissimum* já havia sido relatada por Souza Junior *et al.* (2009), que avaliaram o efeito de diferentes concentrações 1; 3; 5 e 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do OE sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. A partir da concentração de 0,001%, a inibição do crescimento micelial foi total.

Em estudo realizado por (DE CASTRO *et al.*, 2019), analisando a variação sazonal da capacidade antifúngica do OE de *O. gratissimum* (timol/ $\gamma$ -terpinene/p-cimene) constataram que, os constituintes inibiram 100% do crescimento micelial e da esporulação de *C. cassiicola*, na concentração de 0,7  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ . Vários trabalhos relacionam o teor e a composição química do óleo essencial produzido por plantas com a sazonalidade. BOTREL *et al.* (2010) obtiveram maior teor de óleo essencial de *Hyptis marrubioides* no verão e na primavera quando comparados com o teor obtido no inverno. Nos estudos de CUNHA (2011) o óleo essencial de *Aniba duckei* possui maior teor nos meses secos do que nos períodos chuvosos. SANTOS e MARTINS (2007) verificaram diferenças no teor relativo de citral e geraniol no óleo essencial do *Cymbopogon citratus* em função do horário e do local de coleta.



**Figura 12:** Crescimento micelial do fungo *Corynespora cassicola*, em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, após nove dias de cultivo, à temperatura ambiente e sob luz contínua.

### 5.3 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA PRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE ISOLADO DE *Corynespora cassiicola*

Na produção de esporos de *C. cassiicola*, a concentração de 0,2% do OE de *L. sidoides* inibiu 100% a esporulação, enquanto, nessa mesma concentração, o OE de *M. piperita* inibiu 68,60%. Para as demais concentrações e tratamentos, a inibição da esporulação do patógenos foi 100% (Tabela 8).

**Tabela 8:** Porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de *Corynespora cassiicola* submetido a diferentes concentrações dos óleos essenciais

[%]	Porcentagem de inibição da esporulação (PIE %)				
	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Lippia gracilis</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>
0,0	***	***	***	***	***
0,2	100	98,81	68,60 b	94,21	87,79
0,5	100	100	100	100	100
0,7	100	100	100	100	100
1,0	100	100	100	100	100
1,2	100	100	100	100	100
CV (%)	7,66				

Valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os OEs de *L. gracilis* e *M. arvensis*, na concentração de 0,2% inibiram em 100% a germinação de conídios (IGC) do patógeno. Com os demais OEs a inibição de 100% da germinação dos conídios foi obtida a partir da concentração de 0,5%, sendo que para o OE de *O. gratissimum* 100% de inibição foi obtida na concentração de 1,2% (Tabela 9).

**Tabela 9:** Porcentagem de inibição da germinação de conídios (PIG) de *Corynespora cassiicola* mantidas em câmara úmida, em estufa, à 22 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, durante 24 horas.

[%]	Porcentagem de inibição da germinação de conídios (PIG %)				
	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Lippia gracilis</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>
0,0	***	***	***	***	***
0,2	99,37	100	99,71	100	90,80
0,5	100	100	100	100	99,71
0,7	100	100	100	100	99,71
1,0	100	100	100	100	99,71
1,2	100	100	100	100	100

---

CV (%)	2,34
--------	------

---

Valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Há poucos relatos do efeito de OEs na esporulação e germinação de conídios do fungo *C. cassiicola*. *Lippia* spp., apresentou melhores percentuais de inibição da esporulação (PIE). Os OEs de *L. sidoides* e *L. gracilis*, na concentração de 0,2%, inibiram em 100% e 98,81% produção de conídios, respectivamente. O OE de *M. arvensis*, nessa mesma concentração inibiu em 94,21% a esporulação do fungo. Resultados semelhantes foram obtidos em relação a germinação dos conídios, mostrando o potencial dos OEs na inibição da produção e da germinação de conídios do patógeno.

A presença dos fenóis monoterpênicos, timol e carvacrol, presentes no óleo de *L. sidoides* e *L. gracilis* pode ser responsável pela atividade inibitória da esporulação e germinação de conídios de *C. cassiicola*. Zambonelli *et al.* (1996), mencionam que a presença de grupos hidrofílicos na estrutura molecular aumenta significativamente a atividade antibacteriana e/ou antifúngica dos OE. Esses dois bioativos diferem apenas pela posição do grupo OH no anel aromático, diferença apenas estrutural entre as duas moléculas, influenciando muito pouco a ação desses constituintes.

O mentol, um álcool monoterpênico, presente no óleo de *M. arvensis* e *M. piperita* se apresenta como um dos principais bioativos, com potencial de atuar inibindo a esporulação e germinação dos conídios de *C. cassiicola*. Caccioni e Guizzardi (1994), analisando vários monoterpênicos, sejam hidrocarbonetos ou oxigenados com diferentes grupos funcionais (fenóis, aldeídos, cetonas, éteres, epóxidos), relataram que a ação desses compostos é provavelmente resultado da penetração de quitinase na parede da hifa, danificando a membrana citoplasmática fúngica. O mecanismo de ação do timol e do carvacrol deve-se à capacidade que estes apresentam em atravessar a membrana celular do micro-organismo provocando alterações; capacidade esta que pode estar relacionada com as propriedades físico-químicas destas moléculas, considerando suas características lipofílicas e, ao mesmo tempo, devido a sua solubilidade em água (Cristani *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Hammer e Heel, 2012; La Stora *et al.*, 2011). De acordo com Poulou e Croteau (1978), esta ação causa a lise e a liberação de adenosina trifosfato (ATP) intracelular, com consequente morte celular.

De acordo com Aquino *et al.* (2014), a inibição da germinação dos conídios é fundamental no controle das doenças, pois esse tipo de propágulo geralmente é o iniciador da infecção. Para o uso efetivo dos OEs e seu sucesso, é preciso que eles não apenas

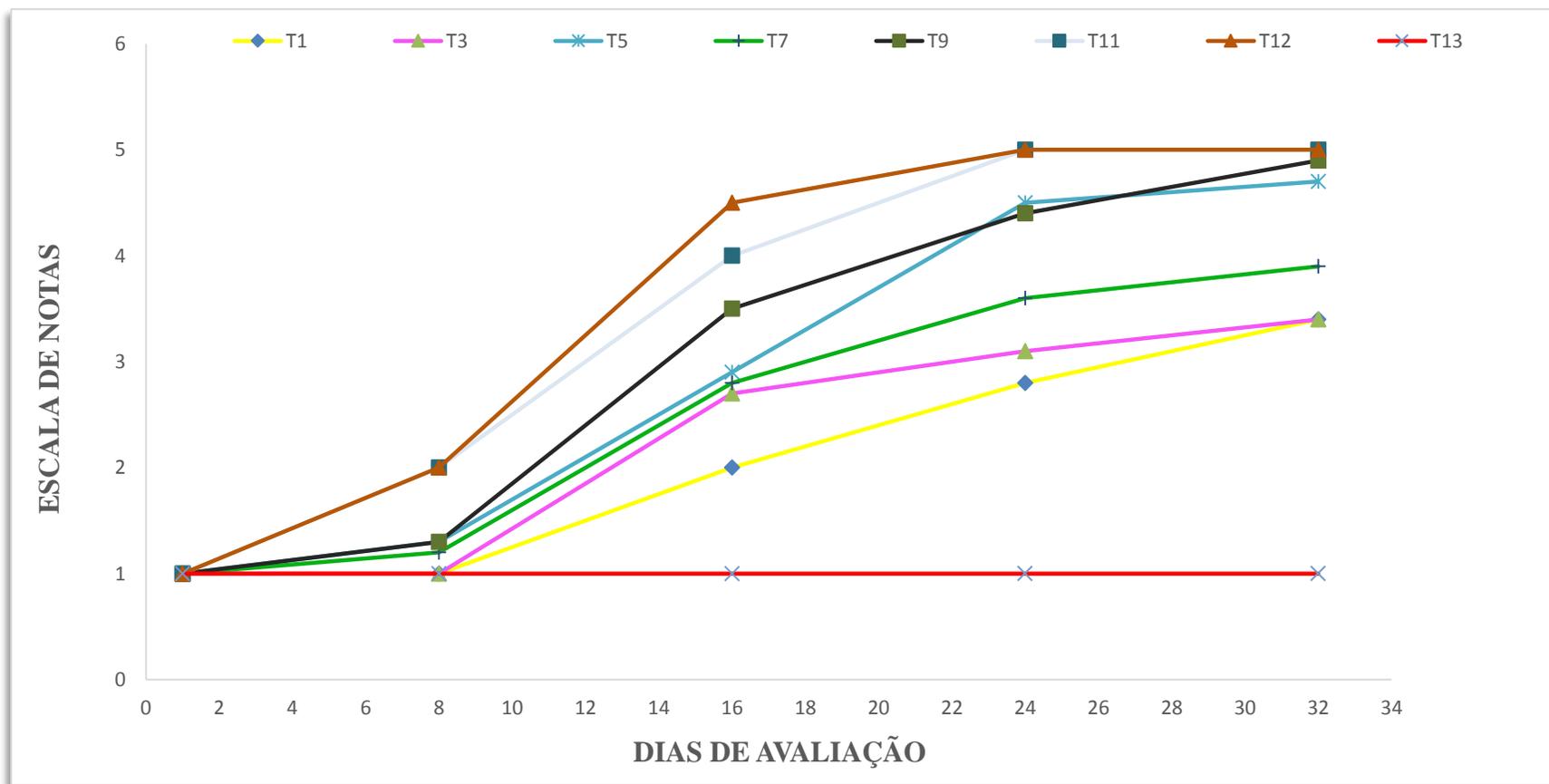
inibam o crescimento micelial do patógeno, mas também inibam a esporulação e germinação de seus conídios.

A partir da análise dos efeitos dos OEs deduz-se que eles apresentam fenóis monoterpênicos e álcoois monoterpênicos não apresentam diferenças significativas frente ao fitopatógeno *C. cassicola*, e ambos inibiram a esporulação e germinação dos conídios do fitopatógenos.

#### **5.4 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA SEVERIDADE DA MANCHA-ALVO EM TOMATEIROS**

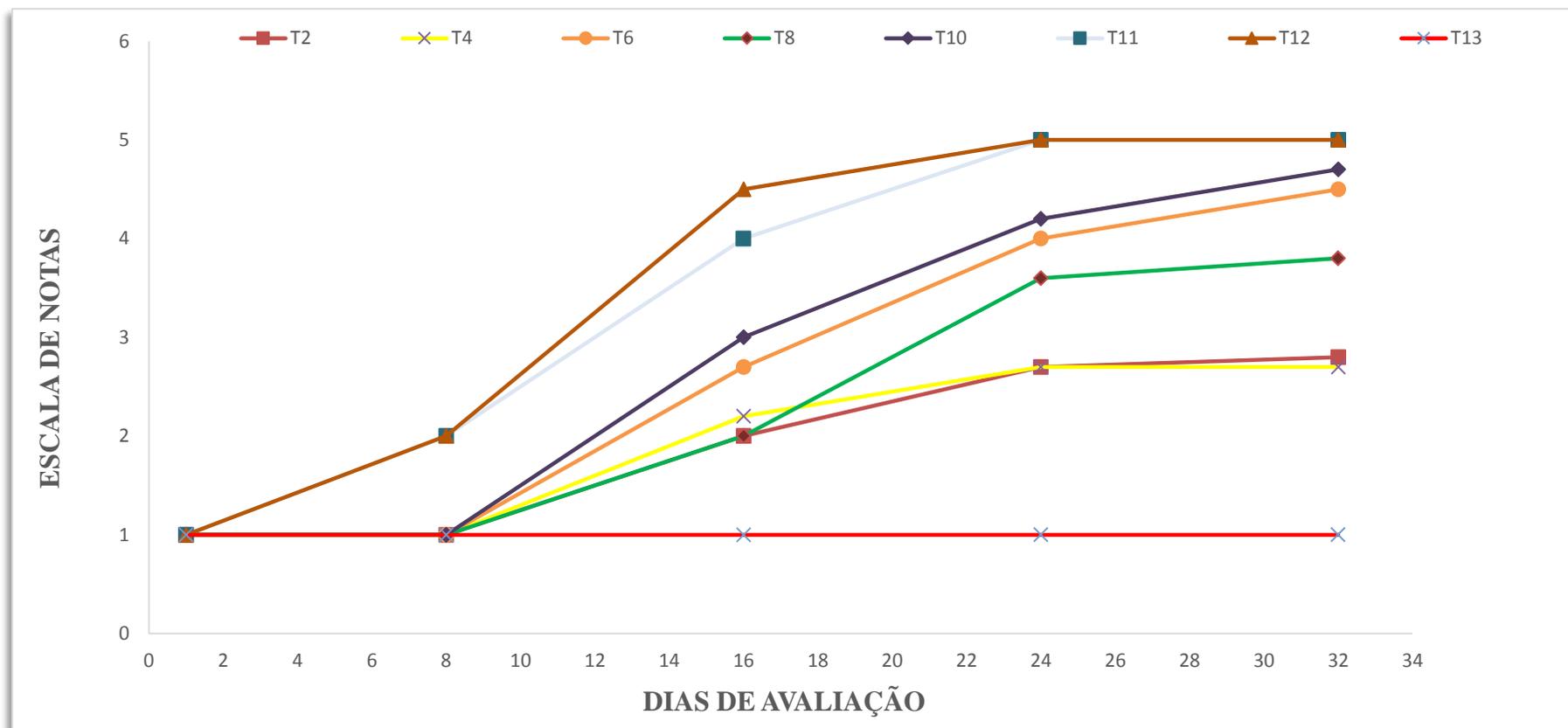
Na avaliação da severidade da mancha-alvo em tomateiros, onde se utilizou duas dosagens para cada óleo essencial, ficou dividido os resultados por dose/concentração (0,2 e 1,0%) para cada tratamento. Constatou-se que os tratamentos utilizando os óleos reduziram ou retardaram o desenvolvimento da doença em casa-de-vegetação (Figura 13 e 14). As plantas tratadas com fungicida Carbendazim (T13) não apresentaram tecidos necrosados, dessa forma, não se observaram sintomas da doença no decorrer dos dias de avaliação.

No experimento *in vivo*, em casa-de-vegetação, percebeu-se que os tratamentos utilizando *M. piperita* (T5, T6), *M. arvensis* (T7, T8) e *O. gratissimum* (T9, T10), apresentaram de pouca à moderada eficiência, sendo incapazes de reduzir a severidade ou retardar o aparecimento dos sintomas, nas duas concentrações avaliadas.



**Figura 13:** Curvas de progresso da mancha-alvo em tomateiros tratados com óleos essenciais na dosagem de 0,2%. T1 – *Lippia sidoides*; T3 – *Lippia gracilis*; T5 – *Mentha piperita*; T7 – *Mentha arvensis*; T9 – *Ocimum gratissimum*; T11 – água destilada (30 mL por planta); T12 – Suspensão de conídios ( $10^6$ -30 mL por planta) e T13 – Fungicida Carbendazim – (dose: 0.8 a 1 L p.c.ha).

**Escala de notas:** 1 – folíolo sadio; 2 – severidade baixa, até 10% de tecido lesionado; 3 – severidade média, 11 a 20% do tecido lesionado; 4 – severidade média-alta, de 21 a 40% de tecido lesionado; 5 – severidade alta, áreas grandes necrosadas com área lesionada acima de 40%.



**Figura 14:** Curvas de progresso da mancha-alvo em tomateiros tratados com óleos essenciais na dosagem de 1,0%. T2 - *Lippia sidoides*; T4 - *Lippia gracilis*; T6 - *Mentha piperita*; T8 - *Mentha arvensis*; T10 - *Ocimum gratissimum*; T11 - água destilada; T12 - Suspensão de conídios ( $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>) e T13 - Fungicida Carbendazim - (dose: 0,8 a 1 L p.c.ha).

**Escala de notas:** 1 - folíolo sadio; 2 - severidade baixa, até 10% de tecido lesionado; 3 - severidade média, 11 a 20% do tecido lesionado; 4 - severidade média-alta, de 21 a 40% de tecido lesionado; 5 - severidade alta, áreas grandes necrosadas com área lesionada acima de 40%.

Observa-se na Figura 13 e 14 que as plantas tratadas com óleos de *L. sidoides* (T1, T2) e *L. gracilis* (T3, T4) nas duas concentrações 0,2 e 1,0% foram capazes de controlar a mancha-alvo, apresentando severidade com notas menores ou iguais a três, dependendo do dia avaliado, reduzindo significativamente a severidade da doença nas plantas e não havendo aumento da severidade da doença no período de avaliação (32 dias).

Os metabólitos secundários, como o timol, presente nos óleos essenciais de *Lippia* spp., aparentemente, proporcionaram melhor ação antifúngica isso se deve aos compostos com estrutura fenólica, terem atuados diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativado mecanismo de defesa das plantas hospedeiras. Romero *et al.* (2013), relatam que vários óleos essenciais que possuem, em sua composição, timol e /ou carvacrol, apresentam atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos.

Mourão *et al.* (2020), avaliando a atividade de diferentes concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5%) do OE de *L. sidoides* no controle da mancha-de-bipolaris, causada por *Bipolaris maydis* (Y.Nisik. & C.Miyake) Shoemaker., de forma preventiva e curativa, constataram que, de forma preventiva, a redução da doença ocorre a partir da concentração de 0,05% e mantem-se, bom nível de controle, nas concentrações de 0,1 a 0,25%. Na maior concentração testada (0,5%) houve uma redução na severidade da doença de até 91%. Já na aplicação curativa, verificou-se, na concentração de 0,1%, maior nível de controle, com redução de 82% na severidade da doença. Assunção *et al.* (2013), avaliando o efeito antifúngico dos extratos brutos aquosos de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e noni (*Morinda citrifolia*) sobre a cercosporiose da alface (*Lactuca sativa*), constataram uma redução no tamanho das lesões, sugerindo efeito sistêmico dos extratos, reduzindo o desenvolvimento do micélio no interior do tecido foliar.

Os OEs de *L. sidoides* e *L. gracilis* se apresentam como fortes candidatos a serem futuramente utilizados como biofungicidas naturais no manejo da mancha-alvo em tomateiro, devido à eficácia apresentado neste estudo. Seus compostos bioativos e metabólitos secundários possuem ação fungistática, comprovada nos ensaios *in vitro* desta pesquisa. Em relação ao manejo *in vivo*, em casa-de-vegetação, os OEs foram capazes de retardar o aparecimento dos sintomas das doenças, desde a primeira avaliação (oitavo dia), o que se presume que esses compostos bioativos são capazes de ativarem na hospedeira, os mecanismos de defesa pós-formados, reduzindo significativamente a severidade da macha-alvo.

Os resultados aqui obtidos sugerem que os OEs das espécies *L. sidoides* e *L. gracilis* podem ser utilizadas como alternativa para o controle da mancha-alvo, devido,

provavelmente, a fração correspondente aos seus princípios ativos timol e carvacrol que apresentam uma destacada participação na composição desses óleos. Podendo ser utilizado á campo em soluções emulsificadas, onde mistura-se a fase oleosa a um solvente orgânico como o etanol, água destilada e um agente emulsificante como o Tween 80 a 0,5%, onde será utilizado pequenas dosagens, sendo aplicado em forma de solução. No entanto, mais estudos devem ser realizados visando a viabilidade dessa técnica, o custo benefício e maiores informações a respeito do efeito desse gênero vegetal e sua ação fungitóxica e fungistática em *C. cassicola*.

## 6. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. gracilis*, *M. piperita*, *M. arvensis* e *O. gratissimum*, apresentaram efeito fungitóxico sobre *C. cassicola*. Nos testes *in vitro*, houve atividade antifúngica contra o patógeno desde a menor concentração 0,2% avaliada e, em condições *in vivo*, os OEs apresentaram atividade capaz de reduzir significativamente a severidade e incidência da mancha alvo em tomateiro nas duas concentrações avaliadas em casa de vegetação, tendo maior atividade os óleos de *L. sidoides* e *L. gracilis*.

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMS RP (2017). **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 809pp.

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p.41–50.

ALBUQUERQUE C.C.; CAMARA, T.R.; MARIANO, R.D.LR.; WILLANDINO, L.; JÚNIOR, C.M.; ULISSES, C. 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535.

ALMEIDA, A.L.; VIDA, J.B.; ROMERO, A.L. 2010. Atividade de monoterpenos naturais sobre *Corynespora cassiicola*. In: **XIX Encontro anual e iniciação científica**, 2010, Universidade Estadual de Maringá (UEM)/Departamento de Agronomia (DAG)/Maringá-PR, Anais do XIX EAIC, Guarapuava – PR, Unicentro. 100pp.

ALVARENGA, J. P. 2018. **Respostas fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas de *Ocimum gratissimum* após a elicitação**. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. 47pp.

ALVARENGA, M.A.R.; COELHO, F.S. 2013. Valor Nutricional. In: ALVARENGA, M.A.R. (Ed.). **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. 2. ed. revisado e ampliado. **Lavras: Editora Universitária de Lavras**, capítulo n. 2, p. 23-29.

ALVES, M. L.; LOURD, M.; NODA, H. 1985. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates em Manaus – AM. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 18, Fortaleza. Resumos... Brasília: SBF, 1985. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 229.

ALVES, F.D.C. 2020. **Interferência de beldroega no tomateiro: suas possibilidades de controle e sua relação com nematóide**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 55 pp.

ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A.M. 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 351–366.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. 2011. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 1, 704pp.

AQUINO, C.F; SALES, N.L.P; SOARES, E.P.S; MARTINS, E.R; COSTA, C.A. 2014. Composição química e atividade *in vitro* de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 2, p. 329-336.

ASSUNÇÃO, E.F.D; SILVA, F.N.T.D; RÊGO, T.J.D; SILVA, L.M.A; SOUSA, A.D; CARVALHO, P.R.S. 2013. Avaliação do efeito dos extratos de *Lippia sidoides* e *Morinda citrifolia* sobre a cercosporiose da alface. **XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013 – UFRPE**: Recife, 09 a 13 de dezembro. 3pp.

ARROYO, F.T., MORENO, J., DAZA, P., BOIANOVA, L.; ROMERO, F. 2007. Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5701-5707.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBOZA, H.S. 2015. **Efeito fungitóxico do óleo essencial de alecrim-da-chapada em *Alternaria* sp.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró. 31pp.

BASTOS, C.N. 1997. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 44-3.

BASTOS, C.N.; Albuquerque, P.S.B. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557.

BEZERRA, E.D.J.D.S. 2009. **Indutores de resistência em pepineiro (*Cucumis sativus* L.) contra a mancha de corínésora [*Corynespora cassiicola* (Berk. e Curt.) Wei]**. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 92pp.

BLAZQUEZ, C.H. 1991. Target spot. In: JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. (Ed.). Compendium of tomato diseases. St. Paul: APS Press. 23pp.

BLAZQUEZ, C.H. 1972. Target spot of tomato. **Plant Disease Report**, v. 56, p. 243-245.

BLISS, F.A.; ONESIROSAN, P.T.; ARNY, D.C. 1973. Inheritance of resistance in tomato to target leaf spot. **Phytopathology**, v. 63, p. 837-840.

BOTELHO, M.A.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C. 2010. Teor e composição química do óleo essencial de Hyptis

marrubioides Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538.

BRITO, A.M.G. 2007. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes. Aracaju, 75pp.

BRITO, D.I.V.; MORAIS-BRAGA, M.F.B.; CUNHA, F.A.B.; ALBUQUERQUE, R.S.; CARNEIRO, J.N.P.; LIMA, M.S.F.; LEITE, N.F.; SOUZA, C.E.S.; ANDRADE, J.C.; ALENCAR, L.B.B.; LAVOR, A.K.L.S.; FIGUEREDO, F.G.; LIMA, L.F.; COUTINHO, H.D.M. 2015. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 (suplemento), p. 836–844.

BRITO, N.M.; NASCIMENTO, L.C. 2015. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 230-238.

BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253.

CACCIONI, D.R.L.; GUIZZARDI, M. 1994. Inhibition of Germination and Growth of Fruit and Vegetable Postharvest Pathogenic Fungi by Essential Oil Components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, n. 2, p. 173–179.

CAFFARO, K.M.T. 2014. **Avaliação biológica in vitro de espécies vegetais da Caatinga: *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis*.** Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 71pp.

CARDOSO, M.G.; SHAN, A.Y.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; DELÚ FILHO, N.; BERTOLUCCI, S.K.V. 2001. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal.** Lavras: UFLA. 81pp.

CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. 2008. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 01-05.

CEZAROTTO, V. S. **Influência da sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam) Pers e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.** 2009. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria (RS), Santa Maria. 113pp.

CHAGAS, H.A.; BASSETO, M.A.; ROSA, D.D.; TOPPA, E.V.B.; FURTADO, E.L.; ZANOTTO, M.D. 2014. Avaliação de fungicidas, óleos essenciais e agentes biológicos no controle de *Amphobotrys ricini* em mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 42-48.

CHAUSSÊ, T.C.C.; DIAS, D.B.S.; SILVA, S.D.V.M.; COSTA, J.C.B.; COSTA, L.C.B. 2011. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacauero. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 9, n. 4, p. 492-496.

COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; RESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. 2011. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 13, n. 2, p. 240-245.

COSTA, C.P.; FERREIRA, M.C. 1991. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 263-268.

COSTA, I.B. 2012. **Avaliação de rizobactérias de solo antrópico, na promoção de crescimento e na indução de resistência contra mancha-alvo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 59pp.

COSTA, S.C.T. 2018. **Fungos endofíticos e extratos vegetais no controle alternativo da mancha-alvo do tomateiro**. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 98pp.

COSTA-CARVALHO R.R. 2011. **Epidemiologia da resinose do coqueiro e sensibilidade de *Thielaviopsis paradoxa* a óleos essenciais**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 80pp.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MICIÉLI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308.

CRUZ, E.M.D.O.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.D.A.; ARAUJO, S.A.D.; ARRIGONI-BLANK, M.D.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.D.H.; BLANK, A.F. 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. (1/2), p. 198-202.

CRUZ, M.D.M.; LINS, S.R.D.O.; OLIVEIRA, S.M.A.D.; BARBOSA, M.A.G. 2012. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, cv. Kent. **Revista Caatinga**, v.25, n.2, p.1-6.

CUNHA, L.N. 2011. Influência sazonal no teor de linalol do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans cultivada em ambiente natural na reserva florestal Ducke. **Ciência e Natura**, v. 33, n. 1, p. 7-15.

DA SILVA BISPO, K.; MELLO, P.L. 2021. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de hortelã pimenta (*Mentha piperita*), hortelã japonesa (*Mentha arvensis*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) frente a cepas ATCC de *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde-UNG-Ser**, v. 15, n. 3/4, p. 17-22.

DANTAS, L.I.S.; ROCHA, F.A.G.D.; MEDEIROS, F.G.M.D.; SANTOS, J.A.B. D. 2010. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre patógenos de importância na indústria de alimentos, **Holos**, v. 5, p. 116-123.

DE CASTRO, J.; MONTEIRO, O.S.; COUTINHO, D.F.; RODRIGUES, A.A.C.; DA SILVA, J.K.R.; MAIA, J.G.S. 2019. Seasonal and Circadian Study of a Thymol/ $\gamma$ -Terpinene/p-Cymene Type Oil of *Ocimum gratissimum* L. and its Antioxidant and Antifungal Effects. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 930-938.

DELLARETTI, E.M. 2014. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Sete Lagoas: UFSJ. 36pp.

DINIZ, S.P.S.S.; COELHO, J.S.; ROSA, G.S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, R.R. 2008. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 9-11.

DINIZ, S.P.S.S., UTUMI, H.; BONZANINI, F.; QUEIROZ, M. 2008. Controle do fungo *Myrothecium verrucaria* por óleos essenciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 60-62.

DORMAN, H.D.; DEANS, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316.

FAO. (2019). Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca4526en>. Acesso em: 07 abr. 2021.

FARIA, T.J.; FERREIRA, R.S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J.R.P.; ISHIKAWA, N.K.; BARBOSA, A.D.M. 2006. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 867-871.

FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.D.; SOARES, M.B.P.; SILVA, T.B.D.; MACHADO, W.D.J.; PRATA, A.P.D.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.D.S.; NOGUEIRA, P.C.D.L.; BEZERRA, D.P. 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytotherapy**, v. 20, n. 7, p. 615-621

FERNANDES, B.D.S. 2016. **Uso da enxertia para o controle da murcha bacteriana [*Ralstonia solanacearum* Smith (1896) (Yabuuchi) et al., 1995] no tomateiro**.

Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas. 56pp.

FERNANDES, L.C.B.; ALBUQUERQUE, C.C.; JÚNIOR, R.S.; OLIVEIRA, F.F.M.; GURGEL, E.P.; MESQUITA, M.V.; SILVA, M.D.S. 2015. Fungitoxicity of plant extracts and essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on the fungus *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 153-155.

FLAMINI, G. 2012. Natural Herbicides as a Safer and More Environmentally Friendly Approach to Weed Control: A Review of the Literature Since 2000. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 38, p. 353–396.

FONTENELLE, R.O.S. 2008. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophyloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. isolados de cães.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 162pp.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; KERNTOPF, M.R.; BRILHANTES, R.S.N, CORDEIRO, R.A.; TOMÉ, A.R.; QUEIROZ, M.G.R.; NASCIMENTO, N.R.F.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 934-940.

FRANCO, C.S.; RIBEIRO, A.F.; CARVALHO, N.C.C.; MONTEIRO, O.S.; SILVA, J.K.R.D.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. 2014. Composition and antioxidant and antifungal activities of the essential oil from *Lippia gracilis* Schauer. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 30, p. 3107-3113.

FREITAS, M.S.M.; MARTINS, M.A.; VIEIRA, I.J.C. 2004. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 887-894.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.D.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.D.V. 2005. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.843-847.

GASPAROTTO, L.; REIS, A.; INOUE-NAGATA, A.K.; COELHO NETO, R.A.; SILVA, G.S. 2019. Principais doenças do tomateiro no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 32pp.

GAZOLLA, P.A.R; TEIXEIRA, R.R.; SILVA, A.M.D.; VAZ, B.G.; VASCONCELOS, G.A.; SIQUEIRA, R.P.; GONÇALVES, V.H.S.; PEREIRA, H.S.; BRESSAN, G.C. 2018. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. **Química Nova**, v. 41, p. 497-506.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930.

GIRME, A.S; BHALKE, R.B; GHOGARE, P.B, TAMBE, V.B; JADHAV, R.S; NIRMAL, S.A. 2006. Comparative in vitro anthelmintic activity of *Mentha piperita* and *Lantana camara* from western India. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 5-7.

GODINHO, W.M. 2011. **Estudo da variação sazonal e circadiana da composição química do óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 208 pp.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M.; MUSSI-DIAS, V.; SILVEIRA, S.F.D.; DOLINSKI, C. 2011. Guava decline: A complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. **Phytopathology**, v. 159, p. 45-50.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; LAU, D. 1999. Crescimento de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* da erva-mate de cinco regiões do estado do Paraná. **Embrapa Florestas- Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1999. 8pp.

GUEDES, J.P.D.S.; MEDEIROS, J.A.D.C.; SILVA, R.S.D.S.; DE SOUSA, J.M.B.; CONCEIÇÃO, M.L.D.; SOUZA, E.L. 2016. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 183-192.

HAMILTON, J.G.C.; HALL, D.R.; KIRK, W.D.J. 2005. Identification of a male-produced aggregation pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 31, n. 6, p. 1369-1379.

HAMMER, K.A.; HEEL, K.A. 2012. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in Staphylococci and Enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 239-245.

HÖFLING, J.F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G.A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. 2010. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1065-1068.

HSOUNA, A.B.; TOUJ, N.; HAMMAMI, I.; DRIDI, K.; AL-AYED, A.S.; HAMDI, N. 2019. Chemical Composition and *in vivo* Efficacy of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. in the Suppression of Crown Gall Disease on Tomato Plants. **Journal of Oleo Science**, v. 68, n. 5, p. 419–426.

IBGE 2018 – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento da Produção Agrícola**.

Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>  
Acesso em: 23 de março 2021.

IBGE 2021 - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2020. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1> Acesso em: 23 de março 2021.

ISEPPI, R.; TARDUGNO, R.; BRIGHENTI, V.; BENVENUTI, S.; SABIA, C.; PELLATI, F.; MESSI, P. 2020. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial activity of essential oils from the Lamiaceae family against *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans* biofilms. **Antibiotics**, v. 9, p. 1-16.

ISMAN, M.B.; WILSON, J.A.; BRADBURY, R. 2008. Atividades inseticidas de óleos comerciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*.) contra larvas de *Pseudaletia unipuncta*. e *Trichoplusia ni*. em relação às suas composições químicas. **Biologia Farmacêutica**, v. 46, n. 1-2, p 82-87.

JONES, JB, ZITTER, TA, MOMOL, TM, & MILLER, SA (Eds.). (2014). Compêndio de doenças e pragas do tomate. St. Paul: **American Phytopathological Society Pres**, p 23.

JOSHI, R. 2013. "Composição química, atividades antimicrobianas e antioxidantes in vitro dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* e seus constituintes principais." **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 457. *Gale Academic OneFile*. Acessado em 25 de janeiro de 2021.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H.M.; VIGENSCHOW, H. 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. **In Progress in Essential Oil Research**; Brunke, E.J., Ed.; Walter de Gruyter: Berlin, Germany. p. 429–445.

LA STORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F.; DI PASQUA, R.; VILLANI, F.; MAURIELLO, F. 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164-172.

LEMONS, J.D.A.; PASSOS, X.S.; FERNANDES, O.D.F.L.; PAULA, J.R.D.; FERRI, P.H.; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, A.D.A.; SILVA, M.D.R.R. 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 55–58.

LI, Y., WANG, H., ZHANG, Y., & MARTIN, C. 2018. Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites? **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 1443-1450.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. 2005. **Doenças fúngicas**. In: Lopes, C. e Ávila, A. (Ed.). Doenças do tomateiro. Brasília Embrapa Hortaliças. p. 17-52.

- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 544pp.
- LUZ, M.J.D.S.; FERREIRA, G.B.; BEZERRA, J.R.C. 2002. **Adubação e correção do solo: procedimentos a serem adotados em função dos resultados da Análise do Solo. Campina Grande: EMBRAPA**. 32pp. (Circular Técnica, 66).
- MACHADO, B.F.M.T.; JUNIOR, A.F. 2011. Óleos essenciais: aspectos gerais e uso em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127.
- MAHENDRAN, G.; RAHMAN, L. 2020 Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha × piperita* L.) - A review. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 9, p. 2088–2139.
- MANH, H.D.; TUYET, O.T. 2020. Larvicidal and Repellent Activity of *Mentha arvensis* L. Essential Oil against *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 11, n. 3, p. 198.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2021. **Assessoria de gestão estratégica projeções do agronegócio, fevereiro de 2021**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 14 fevereiro 2021. MAPA – Ministério da Agricultura.
- MARCELINO Jr., C.A.C.; BARBOSA, R.M.N.; CAMPOS, A.F.; SANTOS, A.P.; LACERDA, C.C.; SILVA CARLOS, E.G. 2005. Utilizando uma cuscuzeira extração de óleo essencial do alecrim-da-chapada (*Lippia gracillis*), uma planta da caatinga. **Química Nova na Escola**, v. 22, p. 51-53.
- Marei, G.I.Kh.; RASOUL, M.A.A.; ABDELGALEIL, S.A.M. 2012. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 103, n. 1, p. 56-61.
- MARTINS, Jr. 2006. **Aspectos da germinação de sementes e influência da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** Dissertação (Mestrado). Lavras: UFLA, 176 pp.
- MATOS F.J.A., OLIVEIRA F. (1998). *Lippia sidoides* Cham. Pharmacognosy, chemistry and phamacology. **Revista Brasileira Farmacologia**. v. 79, p. 84-87.
- MATOS, F.J.A. 1998. **Farmácias vivas**. 3. ed. ver. atual. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará. 220pp.
- MELO, R.S; AZEVEDO, A.M.A.; PEREIRA, A.M.G.; ROCHA, R.R.; CAVALCANTE, R.M.B.; MATOS, M.N.C.; LOPES, P.H.R.; GOMES, G.A.; RODRIGUES, T.H.S.; SANTOS, H.S.D.; JÚNIOR, F.E.A.C.; CARNEIRO, V.A. 2019. Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. Essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3864.

MENDES, M.A.S.; SILVA, V.L.; DIANESE, J.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; SANTOS, C.E.N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A.F.; CASTRO, C. 1998. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 569pp.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M. D. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A.C.D. 2016. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 214.

MOHANTY, N.N.; MOHANTY, N.W. 1955. Target leaf spot of tomatoes. **Science and Culture Calcutta**, v. 21, n. 330-332.

MOHR, F.B.M.; LERMEN, C.; GAZIM, Z.C.; GONÇALVES, J.E.; ALBERTON, O. 2017. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1 p. 1-10.

MORAIS, S. R. D. 2014. **Fitoquímica, morfoanatomia e atividade antimicrobiana de *Lippia sidoides* Cham., *Lippia lupulina* Cham. e *Lippia pohliana* Schauer (Verbenaceae) e atividade farmacológica de *L. sidoides* originária de Minas Gerais**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 103pp.

MOURÃO, D.D.S.C.; SOUZA, M.R.D.; REIS, J.V.D.; FERREIRA, T.P.D.S.; OSORIO, P.R.A.; SANTOS, E.R.D.; SILVA, D.B.D.; TSCHOEKE, P.H.; CAMPOS, F.S.; CAMPOS, F.S.; PEREIRA, T.A.; FARIAS, D.I.O.A.D.; SANTOS, G.R.D. 2020. Fungicidas botânicos no controle da mancha-debipolaris no milho. **Aspectos fitossanitários da agricultura**. Ponta Grossa, PR: Atena. p. 1-16.

NAIKA, S.; JEUDE, J.L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. 2006. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Agrodok. 104pp.

NELSON, D.L.; COX, M.M. 2011. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-5**. Artmed Editora. 1304 p.

NIETO, G. 2017. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae Family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63.

NIST, NIST. 2010. Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook. **National Institute of Standards and Technology**, 2010.

NUMPAQUE, M.A.; OVIEDO, L.A.; GIL, J.H.; GARCÍA, C.M.; DURANGO, D.L. 2011. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 3-13.

OLIVEIRA, S.D.S. 2019. **Fungitoxicidade de óleos essenciais sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum* L.)**. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Dissertação de Mestrado. 68pp.

OLIVEIRA, O.R.D.; TERAQ, D.; CARVALHO, A.C.P.P.D.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C.C.D. 2008. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 1, p. 94-100.

OLIVEIRA, S.D.S.; HANADA, R.E.; BRITO, R.S D. 2019. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1, p. 32-40.

PADALIA, R.C.; VERMA, R, S.; CHAUHAN, A.; GOSWAMI, P.; CHANOTIYA, C.S.; SAROJ, A.; SAMAD, A.; KHALIQ, A. 2014. Compositional Variability and Antifungal Potentials of *Ocimum basilicum*, *O. tenuiflorum*, *O. gratissimum* and *O. kilimandscharicum* Essential Oils against *Rhizoctonia solani* and *Choanephora cucurbitarum*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 10, p. 1934578X1400901.

PANDEY, A.K.; KUMAR, P.; SINGH, P.; TRIPATHI, N.N.; BAJPAI, V.K. 2017. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14.

PAULUS, D.; SANTOS, O.S.; MEDEIROS, S.L.P.; RIFFEL, C.; BORCIONI, E. 2007. Teor e qualidade de óleo essencial de menta em hidroponia. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v. 9, n. 2, p. 80-87.

PEIXINHO, G.S.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R. 2017. Ação do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 32-35.

PEREIRA, A.C.R.L.; OLIVEIRA, J.V.D.; GONDIM JUNIOR, M.G.C.; CÂMARA, C.A.G.D. 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 717-724.

PERNEZNY, K.; SIMONE, G.W. 1999. Target spot of several vegetable crops. Florida Cooperative Extension Services. **Institute of Food and Agricultural Sciences**, University of Florida. 39pp.

POULOSE, A.J.; CROTEAU, R. 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314.

RASOOLI, I.; REZAEI, M.B.; ALLAMEH, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v. 17, n. 5, p. 359-364.

REGENTE, M.C.; OLIVA, C.R.; FELDMAN, M.L.; CASTAGNARO, A.P.; LA CANAL, L. de. 1997. Sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 100, n. 11, p. 178-182.

REIS, A.E.; BOITEUX, L.S. 2007. Mancha-de-corinespora do tomateiro. **Comunicado Técnico, Embrapa Hortaliças**. Brasília-DF. Outubro. ISSN 1414-9850. 6pp.

REIS, A.; MADEIRA, N. 2009. **Diagnóstico dos principais problemas no cultivo de hortaliças no Estado do Amazonas**. Circular Técnica. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças: 12pp.

ROMERO, A.L.; OLIVEIRA, R.R.D.; ROMERO, R.B.; ALMEIDA, A.L.D.; DINIZ, S.P.S.D.S.; VIDA, J.B. 2013. Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 3–7.

SAAD, N.Y.; MULLER, C.D.; LOBSTEIN, A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279.

SANTOS, R.T.; MARTINS, R.C.C. 2007. Variação química da constituição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão). **Revista PIBIC**, v. 4, n. 1, p. 63-70.

SARMENTO BRUM, R.B.C. 2012. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins. 135pp.

SCHLUB, R.L.; SMITH, L.J.; DANTOFF, L.E.; PERNEZNY, K. 2009. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. **II International Symposium on Tomato Diseases**, p. 25-28.

SCHOCH, C.L.; CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; BOEHM, E.W.A.; BURGESS, T.I.; GRUYTER, J.; HOOG, G.S.; DIXON, L.J.; GRUBE, M.; GUEIDAN C.; HARADA, Y.; HATAKEYAMA, S.; HIRAYAMA, K.; HOSOYA, T.; HUHDORF, S.M.; HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; KOHLMAYER, J.; KRUYSS, Å.; LI, YM.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; MARVANOVÁ, L.; MBATCHOU, J.S.; MCVAY, A.H.; MILLER, A.N.; MUGAMBI, G.K.; MUGGIA, L.; NELSEN, M.; NELSON, P.; OWENSBY, C.A.; PHILLIPS, A.J.L.; PHONGPAICHIT, S.; POINTING, S.B.; PUJADE-RENAUD, V.; ROBBERTSE, B.; RUIBAL, C.; SAKAYAROJ, J.; SANO, T.; SELBMANN, L.; SHEARER, C.A.; SHIROUZU, T.; SLIPPERS, B.; SUETRONG, S.; TANAKA, K.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; WINGFIELD, M.J.; WOOD, A.R.; WOUDEBERG, J.H.C.; YONEZAWA, H.; ZHANG, Y.; SPATAFORA, J.W. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. **Studies in mycology**, v. 64, n. 1, p. 1–15.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. 2000. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa, MG: UFV. 135pp.

SILVA, J.A. 2015. **Caracterização fisiológica e enzimática de *Colletotrichum* spp. Agente causal da antracnose em frutos de *Capsicum chinense* Jacq.** Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 73pp.

SILVA, J.S.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, S.P.S.S. 2012. Óleo essencial de *Mentha arvensis* L. como agente no controle de fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, p. 99-100.

SILVA, M.R.R.; OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; FERNANDES, O.F.L.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, J.A.; PAULA, J.R. 2005. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. **Mycoses**, v. 48, n. 3, p. 172–175.

SILVA, V.A.D.; FREITAS, A.F.R.D.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P.; PEREIRA, M.D.S.V. 2008. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* da *Lippia sidoides* Cham. sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 4, p. 7-11.

SILVA, WJ, DÓRIA, GAA, MAIA, RT, NUNES, RS, CARVALHO, GA, BLANK, AF, ALVES, PB, MARÇAL, RM & CAVALCANTI, SCH. 2008. Efeitos de óleos essenciais em larvas de *Aedes aegypti*: alternativas a inseticidas ambientalmente seguros. **Tecnologia de biorrecursos**, v. 99, n. 8, pág. 3251-3255.

SIMMONDS, J. H. 1956. Science Branch. Plant Pathology Section. **Science Branch Plant Pathology Section**, v. 58, p. 58-59.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 322–328.

SMITH, E.F. 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato. **United State Department Agriculture Division Vegetal Physical Pathology Bulletin**, v. 12, p. 1- 26.

SOARES, B.V. 2016. **Efeitos antiparasitários e fisiológicos de *Lippia* spp. (VERBENACEAE) em *Collossoma macropomum* e uso dessas plantas na medicina veterinária e aquicultura**. Tese (doutorado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Macapá, 135pp.

SOUSA GUEDES, J.P.; MEDEIROS, J.A.C.; SILVA, R.S.S.; SOUSA, J.M.B.; CONCEIÇÃO, M.L.; SOUZA, E.L. 2016. The efficacy of *Mentha arvensis* L. M. *piperita* L. Essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p.183-192.

SOUZA JUNIOR, I.T.; SALES, N.L.P.; ERNANE, R.M. 2009. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83.

TOFFANO, L. 2010. **Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citrus**. Tese (Doutorado). Piracicaba, 78pp.

UGULINO, A.L.N.; MENDONÇA JUNIOR, A.F.D.; RODRIGUES, A.P.M.D.S.; SANTOS, A.B.; FRANÇA, K.R.D.S.; CARDOSO, T.A.L.; PRADO JUNIOR, L.S.D. 2018. Inhibition effect of vegetable oils on the mycelial growth of *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 6, p. 49-56.

VELOSO, R.A. 2016. **Óleos essenciais como controle alternativo de fitopatógenos**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins. Gurupi. 72pp.

VERAS, H.N.H.; RODRIGUES, F.F.G.; BOTELHO, M.A.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.D. 2014. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–5.

WEI, C.T. 1950. “Notes on *Corynespora*”. **Mycological Papers**, v. 34, p. 1-10.

XU, J.; ZHOU, F.; J.I, B.P.; PEI, R.S.; XU, N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174-179.

YABUUCHI, E. 1995. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. nov. **Microbiol. Immunol.**, v. 39, n. 11, p. 897-904.

ZAMBONELLI, A.; D`AULERIO, A.Z.; BIANCHI, A.; ALBASINI, A. 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9-10, p. 491-494.